分类号：R630 密 级： UDC： 610

编 号 ：201009001



**攻读 博士 学位 研 究 Th 毕 业 论文**

**藏羚羊 STAT3、HIF-1α和 HIF-2α基因表达的Th物学意义**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 指 | 导 | 教 | 师：格日力教授 |
|  |  |  | 李占全教授 |
| 学 | Th | 姓 | 名：刘芳 |
| 论 | 文 | 类 | 型：基础研究 |

学科专业名称：内科学 研 究 方 向：高原低氧适应机制学院(系、部)：高原医学研究中心

**论文起止时间：2009.02-2012.03**

**Doctoral Dissertation Qinghai University**

**Biological Significance of signal transducer and activator of transcription 3, hypoxia inducible factor 1 alpha and hypoxia inducible factor 2 alpha in High Altitude Hypoxic Adaptation Species---Tibetan antelope**

**Fang** Liu (Internal **Medicine)**

**Directed by Professor Rili Ge**

**Research Center of High Altitude Medicine, Qinghai University Medical College, Xining, Qinghai, P.R.China**

**Mar, 2012**

略语表................................... **错误!未定义书签。**

目 录

[中文摘要](#_Toc686873098) 6

**[Abstract](#_Toc686873099)** 6

[第一章 前言](#_Toc686873100) 7

[第二章 材料与方法](#_Toc686873101) 8

**[2.1](#_Toc686873102)** [材料](#_Toc686873102) 8

**[2.2](#_Toc686873103)** [方法](#_Toc686873103) 12

[第三章 实验结果](#_Toc686873104) 23

**[3.1](#_Toc686873105)** [肺、肝、肾、心肌和骨骼肌组织总](#_Toc686873105)**[RNA](#_Toc686873105)**[提取](#_Toc686873105) 23

**[3.2](#_Toc686873106)** [目的基因的](#_Toc686873106)**[PCR](#_Toc686873106)**[扩增及测序结果分析](#_Toc686873106) 23

[3.3 目的基因mRNA的表达结果](#_Toc686873107) 58

[3.4 目的蛋白的表达结果](#_Toc686873108) 63

[第四章 讨论](#_Toc686873109) 65

[参 考 文 献](#_Toc686873110) 66

[第五章 结论](#_Toc686873111) 68

[第六章 文献综述](#_Toc686873112) 68

[参 考 文 献](#_Toc686873113) 69

[在校期间发表的论文](#_Toc686873114) 71

[学位论文独创性声明](#_Toc686873115) 71

[学位论文知识产权权属声明](#_Toc686873116) 71

**略语表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文名称 | 中文名称 |
| m | meter | 米 |
| cm | centimeter | 厘米 |
| L | liter | 升 |
| ml | milliliter | 毫升 |
| μl | microliter | 微升 |
| mg | milligram | 毫克 |
| μg | microgram | 微克 |
| min | minute | 分钟 |
| sec | second | 秒 |
| rpm | Revolutions per minute | 转/分 |
| V | volt | 伏特 |
| mA | milliampere | 毫安 |
| kb | Kilobase pair | 千碱基 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| kDa | kilodalton | 千道尔顿 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| cDNA | Complementary deoxyribonucleic acid | 互补脱氧核糖核酸 |
| RNA | Ribonucleic acid | 核糖核酸 |
| ORF | Open reading frame | 开放阅读框 |
| Tm | Melting temperature | 解链温度 |
| UTR | Untranslated region | 非翻译区 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| RT | Reverse transcriptation | 逆转录 |
| RACE | Rapid amplification of the cDNA end | 末端快速扩增法 |
| Amp | ampicillin | 氨苄青霉素 |
| ddH2O | Double distilled water | 双蒸水 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| DEPC | diethylpyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| EBr | Ethidium bromide | 溴化乙锭 |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| IPTG | isopropy-β-D-thiogalactoside | 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 |
| Tris | tris-(hydroxymethyl)aminomethane | 三羟基甲基氨基甲烷 |
| AP | Ammonium persulfate | 过硫酸铵 |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfonate | 十二烷基磺酸钠 |

# 中文摘要

氧平衡状态的维持是需氧生物生存的根本前提。青藏高原环境的低氧独特性深刻影响着生物的分布、种群结构、生存适应和进化模式。藏羚羊(Tibetan antelope, *Pantholops hodgsonii*)是青藏高原土著动物中最具运动能力和低氧耐受能力的特有珍稀野生物种。该物种常年生活在海拔4300~5500 m的高ft草原、草甸和高寒荒漠地区，在生理、形态和基因水平上已获得稳定的低氧适应性遗传学特征，也形成了能够在低氧环境中生存的独特低氧适应机制。该机制的建立归结于机体内诸多抗低氧基因的表达水平发生了可调节性改变。在众多的抗低氧基因中，信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、低氧诱导因子-l(hypoxia inducible factor-l, HIF-l)、低氧诱导因子-2(hypoxia inducible factor-2, HIF-2)是氧信号转导系统的核心转录因子，它们对于调节细胞低氧适应性反应、维持机体氧平衡状态和能量平衡状态起着关键性作用。

STAT3是整合多种信号通路的关键性信号级联成分，具有信号转导与转录激活的功能。它可调控血管新生、能量代谢、细胞生长、存活与凋亡等途径中多种低氧反应性基因的表达，其中*hif-1*是STAT3的重要下游靶基因。HIF-1是关键性氧依赖转录激活因子。它通过诱导糖代谢、血管新生、红细胞生成、氧摄取及运输等途径中众多低氧反应性基因的表达，参与细胞内氧平衡状态的调节。HIF-2也是重要的氧依赖转录激活因子。同作为低氧诱导因子（hypoxia inducible factors，

HIFs）家族成员，HIF-1和HIF-2均由氧调节亚基α和结构亚基β组成，α亚基是调节HIF-1、HIF-2活性的功能亚单位。HIF-1α、HIF-2α的氨基酸序列有48%的同源性，有很相似的结构域。HIF-1和HIF-2调节的下游靶基因既有重叠又各具特异性。HIF-2作用的靶基因主要涉及骨髓造血、血管生长、血管收缩、能量代谢、儿茶酚胺合成和铁代谢等方面。低氧条件下，HIF-1和HIF-2是以功能互补、协同作用的方式，促进细胞对低氧的适应调节，维持机体的氧平衡状态。可见，STAT3、HIF-1、HIF-2作为氧信号转导系统的重要转录因子，对于调节细胞低氧适应性反应起重要作用。我们推测上述三因子可能在藏羚羊的高原低氧适应机制中也扮演重要角色。但是藏羚羊*stat3*、hif-1α、*hif-2α*cDNA的克隆及组织表达特征鲜为报道，这一部分却是藏羚羊低氧适应分子机制研究中的重要内容，故本研究以高海拔藏羚羊和藏系绵羊及低海拔绵羊为材料分析了*stat3*、hif-1α、hif-2α的组织表达情况和低氧适应性差异，进而揭示藏羚羊在自然生活条件下*stat3*、hif-1α、hif-2α

基因的表达特征及其对该物种生存适应的生理意义。

本研究以高海拔藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊为材料，采用RT-PCR、3′，5′RACE PCR扩增分别获得藏羚羊*stat3*、hif-1α的cDNA克隆以及hif-2α的部分编码区序列，利用Real-time PCR和Western blot方法分析了藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊*stat3*、hif-1α、hif-2α的mRNA及蛋白的组织表达情况和低氧适应性差异。主要研究结果如下：

1）序列分析结果显示，（a）藏羚羊*stat3*基因的cDNA序列为4288bp，包含2312bp的开放阅读框、29bp的5′UTR区和1947bp的3′UTR区。它的编码区序列和预测的氨基酸序列与其它哺乳动物*stat3*的相似性超过86%，其中与牛相似性最高，达到

98%以上。（b）藏羚羊hif-1α基因的cDNA序列为3664 bp，包含2471 bp的开放阅读框和1191 bp的3′UTR区，它的编码区序列和预测的氨基酸序列与其它哺乳动物hif-1α的相似性超过87%，其中与牛相似性最高，达到98%以上。（c）藏羚羊*hif-2α*基因的部分编码区序列为515bp，它的核苷酸序列与其它哺乳动物hif-2α的相似性为88% ~ 97%左右，其中与牛的HIF-2α序列相似性最高。上述结果表明本实验获得藏羚羊*stat3*、hif-1α基因的cDNA序列和hif-2α基因的部分编码区序列。

2）Real-time PCR和Western blot结果显示，（a）无论是mRNA水平还是蛋白水平，藏羚羊*stat3*、hif-1α、hif-2α在肺、肝、肾、心肌、骨骼肌组织中均有明显表达，且存在表达的组织差异性。与低海拔绵羊相比较，藏羚羊和藏系绵羊STAT3、HIF-1α、HIF-2α的蛋白表达量在上述五种组织中呈明显增高趋势。（b）以低海拔绵羊为对照，藏羚羊、藏系绵羊*stat3*、hif-1α、*hif-2α*mRNA的表达变化趋势并不一致。藏羚羊*stat3*、hif-1α、*hif-2α*mRNA在上述五种组织中的表达量均高于低海拔绵羊。藏系绵羊*stat3*、hif-1α、*hif-2α*mRNA的表达量在五种组织中的变化趋势各具特点，其中骨骼肌组织中各因子的mRNA表达量无明显差异。推测*stat3*、hif-1α、hif-2α的低氧特异性表达及表达增高可能是藏羚羊和藏系绵羊高原低氧适应能力和遗传学特征的分子基础。而同海拔藏羚羊和藏系绵羊之间所存在的*stat3*、

hif-1α、hif-2α基因的表达差异性，则提示藏羚羊和藏系绵羊的低氧适应机制各不相同，它们依据各自的生存环境建立独特的低氧适应机制，这也进一步揭示藏羚羊，藏系绵羊在高原环境中遵从优胜劣汰、长期进化、适者生存的规律。

关键词：信号转导与转录激活因子3；低氧诱导因子 -1α；低氧诱导因子 -2α；藏羚羊；基因克隆；基因表达；低氧适应

**Abstract**

The maintaining of oxygen homeostasis is the fundamental precondition of aerobic organisms' normal life activities. The hypoxic uniqueness of the

Qinghai-Tibet Plateau environment has a great impact on the distribution, structure, function, adaptation, and evolutionary patterns of various organisms. Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*), is a rare wild species of the Qinghai-Tibet Plateau, which

Has the strongest sports ability and hypoxia resistant ability among aboriginal animals of the Qinghai-Tibet Plateau. It perennially lives in alpine meadow, prata, alpine-cold desert areas at the altitude of 4300~5500m. During long term evolutions, the species has already achieved genetic features of hypoxia adaptation in high altitude at physiology, morphology and gene level, and has already formed unique adaptation mechanisms. The establishment of the adaptation mechanism due to expression levels of hypoxia-adaptive genes can be adjusted to change. In a large number of

Hypoxia-adaptive genes, Signal transduction and activator of transcription factor 3(STAT3), Hypoxia inducible factor-1(HIF-1), Hypoxia inducible factor-2(HIF-2) is the core transcription factors of the oxygen signal transduction system. They play a key role in regulating cell hypoxia adaptive response to maintain body oxygen equilibrium and energy balance status.

STAT3 is the key signaling cascade components which integrate signals of multiple signaling pathways, having functions of signal transducing and transcription controlling. It regulate gene expressions of hypoxia response in various ways, such as [cell](http://www.iciba.com/cell/) proliferation, survival and apoptosis, angiogenesis, energy metabolism, which

*Hif-1* is an important downstream target genes of STAT3. As a critical

Oxygen-dependent transcriptional activator, HIF-1 through the induction of glucose metabolism, angiogenesis, erythropoiesis, many of hypoxic response gene expression in oxygen uptake and transport pathway involved in the regulation of the intracellular oxygen equilibrium. HIF-2 is also a critical oxygen-dependent transcriptional activator. With family members as hypoxia inducible factors (HIFs), HIF-1 and HIF-2

Are compose of the oxygen regulation of subunit alpha and the structure of subunit beta. Alpha subunit is the regulation of HIF-1 and HIF-2 activity. HIF-1α, HIF-2α, 48% of the amino acid sequence homology, have very similar structural domains. HIF-1 and HIF-2 regulation of downstream target genes both overlap and each with specificity. HIF-2 target genes that mainly involves the bone marrow, blood vessel

Growth, vascular contraction, energy metabolism, catecholamine synthesis and iron metabolism. Under hypoxic conditions, HIF-1 and HIF-2 are in a function complementary, synergistic manner that promote cell adaptation to hypoxia regulate and maintain the body′s oxygen equilibrium. In summary, as important transcription factors of the oxygen signal transduction system, STAT3, HIF-1 and HIF-2 play an important role in the regulation of cell hypoxia adaptive responses. We speculate that STAT3, HIF-1 and HIF-2 plays a very important role in Tibetan antelopes′adaption mechanisms to hypoxia. But there are few reports on the cloning and tissue expression characters of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*cDNA, which are the important content of the research on the hypoxia adaption molecular mechanism of Tibetan antelope. So this research analyzed the differences of the tissue expression and hypoxia adaption of *stat3*, *hif-1α*and hif-2α, with Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep as

Materials, further uncovered the meaning of these genes expression character in nature and the physiological significance of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*for Tibetan antelope to survive.

In this study, the cloning of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*gene cDNA of Tibetan antelope, using RT-PCR and RACE, was applied, as well as the comparative analysis of the tissue-specific expressions of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep(*Ovis aries*), using Real-time PCR and Western blot. The main achievement of this study is listed as follows:

1) Sequence analysis revealed that (a) The full-length Tibetan antelope *stat3* cDNA, which cloned by gene sequence analysis, is 4288bp, comprising a 2312bp open reading frame (ORF), a 29bp 5′UTR and a 1947bp 3′UTR. The similarity between its coding sequence, predicted amino acid sequence and *stat3* of other mammals exceeded 86%, in which the similarity with cow was up to more than 98%. (b) The cDNA sequences acquired by cloning from the *hif-1α*gene of Tibetan antelope comprised a 2471bp ORF and a 1911bp 3′UTR. The similarity between its coding

Sequence, predicted amino acid sequence and *hif-1α*of other mammals exceeded 87%, in which the similarity with cow was up to more than 98%. (c) Partial coding region sequence of Tibetan antelope′s *hif-2α*gene is 515bp. Similarity between its coding sequence and *hif-2α*of other mammals is about 88% ~ 97%, in which the similarity with cow is the highest. The results indicate that cDNA sequences of Tibetan antelope′s *stat3* and *hif-1α*and partial coding region sequence of Tibetan antelope′s

*Hif-2α*gene were obtained.

2) Real-time PCR and Western blot analysis revealed that (a) Both the mRNA level or protein level, *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*of Tibetan antelope′s were significantly expressed in the lung, liver, kidney, cardiac muscle, skeletal muscle tissue and there are organizational differences in expression. The compare of the same tissues among the three kind of animals shows that the expression of STAT3, HIF-1αand HIF-2αprotein in the five tissues of Tibetan antelope and Tibetan sheep are all more than that of sheep. (b) Sheep as control, there were not consistent between the expression of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*mRNA in the five tissues of Tibetan antelope and them of Tibetan sheep. The expression of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*mRNA in the five tissues of Tibetan antelope are all more than that of sheep. However, there were various characteristics about the expression of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*mRNA in the five tissues of Tibetan sheep, in which expression of these factors′mRNA was no significant difference in skeletal muscle. We speculated that the tissue specific expression and higher expression of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*is molecular basis of Tibetan antelope and Tibetan sheep′s adaptability and genetic features. The expression of *stat3*, *hif-1α*and *hif-2α*gene differences between Tibetan antelope and Tibetan sheep, although they live in the same altitude. It indicates Tibetan antelope and Tibetan sheep establish their own unique hypoxia adaptation mechanisms based on their living environment. It further announced that Tibetan antelope and Tibetan sheep comply with the laws of optimizing, long-term evolution and survival of the fittest in the highland environment.

**KEy words**: signal transducer and activator of transcription 3; Hypoxia inducible factor 1 alpha; Hypoxia inducible factor 2 alpha; Tibetan antelope; Genetic cloning; Genetic expression; Hypoxia adaptation

# 第一章 前言

氧平衡状态的维持是需氧生物生存的根本前提。当环境氧分压低于正常水平或机体内环境组织氧分压降低时，会出现需氧生物体内氧稳态失衡的现象，这可引发机体、组织器官、细胞生理功能受限甚至终止[1]，故生物体力图通过建立低氧适应性机制保持自身的氧平衡状态，维持其生命活动的正常进行。

青藏高原是全球平均海拔最高的地理单元，此地域大气氧分压仅为海平面的

53%～62%。高寒、低氧、强紫外线辐射的独特环境深刻影响着生物的分布、种群结构、生存适应和进化模式，形成了高原生物、生态特有的物竞天择，适者生存的客观规律。高原特有的生物系统与低氧环境相互适应，表现出高原生物的独特性、适应性、系统性、差异性。依靠这些特性，它们能够免受劣势环境因素的伤害，且能有效地从其生境中获取所需的物质和能量，达到机体与环境间的平衡状态。世代生息在青藏高原的世居人群和土著动物经过漫长的进化过程建立了完善的高原低氧适应机制，该机制确保他们能够最大限度地摄取及利用氧，维持体内氧平衡状态[2]。此低氧适应机制支撑环境缺氧下生物体生命功能的正常运转，同时高原低氧环境引起氧平衡状态紊乱参与各种急、慢性高原病的发病机制与临床医学、环境医学、运动医学、极地医学、潜水医学、航天医学等领域中氧稳态失衡相关疾病的发生与转归密切相关。高原低氧适应机制的研究在环境低氧适应这一科学问题的探讨中占具核心地位，同时在低氧相关医学领域具有明确的推广意义，因此诸多低氧领域的学者以高原特有生物如高原世居人群、野牦牛(yak)、高原鼠兔(pika)等为研究对象，进行了生理学或形态学层面的解析。发现经过长期优胜劣汰的自然选择，高原世居人群和土著动物的肺通气能力、心脏泵血功能、新生血管形成、红细胞数、血红蛋白含量或氧亲和力等普遍得到提升，此结论已得到共识，成为青藏地区生物生存的一般规律[3-9]。经对他们生理特征的深入研究和对多种低氧适应相关基因的初步探讨，证明这种对低氧适应所产生的器官功能变化，归结于诸多抗低氧基因的诱导表达和细胞代谢的进一步调整，以达到在高原低氧环境中世代繁衍的目的。

藏羚羊(Tibetan antelope, *Pantholops hodgsonii*)隶属于青藏高原土生种偶蹄目，牛科，藏羚羊属，常年生活在海拔4300~5500 m的高ft草原、草甸和高寒荒漠地区，它能以60 km的时速连续奔跑70~100 km，是青藏高原土著动物中最具运动能力和低氧耐受能力的特有珍稀野生物种。该物种在生理、形态和基因水平

上已获得稳定的高原低氧适应性遗传学特征，如动脉血氧饱和度高；肺组织富含

Ⅱ型细胞；心血管系统对低氧刺激耐受；线粒体中与氧传递相关基因的位点、片段长度和重复序列出现特异性变化；α-珠蛋白发生N132S、S134G的位点突变等方面，均说明藏羚羊为了在低氧环境中生存，形成了自己独特的低氧适应机能

[10-13]。这对维护青藏高原生态系统平衡起到重要作用。

信号转导与转录激活因子(signal transducers and activators of transcription,

STATs）存在于细胞浆内，是由生长因子、细胞因子等多肽类配体激活后转入细胞核的DNA 结合蛋白家族，具有信号转导和转录调控双重功能[14]。该家族包括

STAT1, STAT2，STAT3，STAT4，STAT5a，STAT5b，STAT6 七个成员。作为

STATs家族的重要成员，STAT3广泛表达于哺乳动物的不同类型组织和细胞中。

STAT3蛋白约含750-795个氨基酸，分子量约84-113 kDa，蛋白分子结构中共有

6 个功能区[15]，结构如下（图1.1）：



（1）氨基端结构域(amino-terminal domain, NH2): 约包含130个氨基酸，其空间独立折叠结构具有稳定性[16]，有助于STAT3与转录辅激活因子p300/CREB-binding

protein(CBP)、Protein Inhibitor of Activated Stat(PIAS)家族和受体区域之间相互结合。NH2还参与了STAT3二聚体的形成并调节STAT3 的核转位过程[17]。(2)卷曲螺旋域(coiled-coil domain, CCD): NH2与CCD通过含有4个α单环的18个氨基酸相连。CCD位于第135和315位氨基酸之间，为STAT3的主要亲水面，可与p48/Interferon regulatory factor 9(IRF9)，转录因子c-Jun, N-myc等螺旋状蛋白相结合。近期研究表明，CCD也参与受体结合、酪氨酸磷酸化以及核转运的过程[18, 19]。(3) DNA结合区(DNA binding domain, DBD): DBD位于第320-480位氨基酸之间，由β桶状（β-barrel）蛋白和免疫球蛋白折叠构成。是STAT3与DNA的特定结合位点[20]。(4)连接区域(Linker domain): 位于第465-585位氨基酸之间，连接DBD和SH2二聚体化功能域。(5) SH2结构域(Src-homology 2, SH2): 位于第580-680位氨基酸之间，是STATs蛋白最保守的区域。SH2具有结合特异

性酪氨酸活化模序的能力，在信号转导中发挥以下重要作用：通过识别特异性受体酪氨酸模序与细胞因子受体相结合；与JAK的活化相关；参与STAT3同源或异源二聚体的形成。（6）羧基端转录活性区域(carboxy-terminal transcriptional activation domain, TAD): STAT家族各成员蛋白的结构高度保守，TAD是决定各自编码蛋白特异性的主要结构域。当第701、705位酪氨酸发生磷酸化后STAT3即呈活化状态，通过分子间SH2结构域的相互作用形成二聚体转位入核，与特定基因的启动子相结合，调节靶基因的转录。第727位的丝氨酸磷酸化位点是影响STAT3转录活性的主要因素。

目前已明确，Src相关激酶的非受体型酪氨酸酶激活作用、JAK2/STAT3、Ras-MAPK等信号转导途径均可磷酸化STAT3的Tyr701、Tyr705、Ser727位点，活化STAT3蛋白，促使其以活化形式进入细胞核，借助磷酸化STAT3蛋白分子结构中的SH2和TAD结构域识别特定基因的DNA序列，调控血管新生、能量代谢、细胞生长、存活与凋亡途径中低氧诱导因子-l(hypoxia inducible factor-l, HIF-l)等多种低氧反应性基因( hypoxia responsive genes, HRG)的表达[21-23]，进而通过诱导低氧状态下新生血管生成以增加氧供[24]；定位于线粒体，通过氧化磷酸化产生能量，同时提高能量代谢相关基因的表达，增强非颤栗性产热功能[25, 26]；介导心肌的适应性保护，降低心肌细胞的低氧损伤[27, 28]等作用来调节细胞的低氧适应能力

[29]. 因此，STAT3成为低氧条件下调节细胞低氧适应性反应的重要转录因子。

缺氧胁迫时，机体会使低氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)表达的稳定性增高。HIFs是介导缺氧信号与众多低氧诱导基因转录激活的重要调控因子，对于低氧环境中细胞和机体氧稳态调节具有非常重要的作用。一般认为，HIFs的低氧适应调节作用是通过其调控的下游靶基因介导的。HIFs作为反式作用因子可与HRG上的低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)相互作用，调控包括促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等在内的多种下游基因的转录和翻译[30, 31]。这些基因产物可通过增加缺氧细胞的能量产生和利用效率、增加氧的供应和降低氧的消耗来维持其在缺氧环境中的生存，使机体产生低氧适应性反应。HIFs由α和β两个亚基构成，其中α亚基为调节亚基[32]，β为构建亚基。α亚基属于碱性螺旋-环-螺旋(basic-helix-loop-helix, bHLH) -PAS(Per/ARNT/Sim, PAS)超家族[33]。在常氧状态下半衰期很短，只有在缺氧状况下，α才会与构建亚基β二聚化形成HIF[34]。

目前发现，HIF-α亚基有3种异构体，分别是HIF-lα，HIF-2α，HIF-3α。其中HIF-lα、HIF-2α是细胞在缺氧应答反应中最重要的调节因子[35]。低氧条件下，HIF-lα和HIF-2α调控的下游基因不完全相同，表达模式也显示出一定的差异，使它们表现出既相似又各自独特的生物学功能[36, 37]。

HIF-lα是在低氧条件下广泛存在于哺乳动物及人体内的一种转录因子，参与机体对缺氧的反应，诱导抗低氧基因的表达和调控细胞的氧平衡状态。在低氧条件下，除了作为STAT3的重要下游靶基因，与STAT3共同参与血管新生等低氧适应性生理功能的调节外，还调控细胞存活、无氧代谢、免疫反应、细胞因子生成以及维持内环境稳态等方面。HIF-lα蛋白含826个氨基酸残基，其N端（氨基酸l~390）由碱性bHLH和PAS结构域组成，是与HIF-lβ形成异二聚体和结合DNA上顺式反应元件的区域。HIF-lα的C端决定了氧调节的稳定性和蛋白的转录活性，包括2个反式激活域(transactivation domain, TAD)即NTAD(氨基酸531~575)和CTAD(氨基酸756~826)[38,39]，这2个TAD之间为抑制结构域（inhibitory domain，

ID），能抑制该分子在正常氧条件下的反式激活作用[40]。此外，HIF-lα还存在一个特殊的氧依赖降解区(oxygen-dependent degradation domain, ODDD)，位于氨基酸401~531，以及两个核定位信号(nuclear localization signal, NLS)，分别位于N端的氨基酸17~33和C端的氨基酸718~721，其中C端的NLS在介导HIF-lα进入细胞核的过程中起着关键作用[41]。HIF-1α的表达调节包括基因水平和蛋白质水平，其中以蛋白质水平为主。缺氧作为蛋白质水平上调节HIF-1α表达的最主要因子诱导HIF-lα表达后，通过（1）诱导低氧状态下新生血管生成以增加氧供

[42-45]；（2）调节细胞的代谢模式，以无氧代谢适应低氧环境[46-48]；（3）降低组织细

胞的低氧损伤[49]等作用，来实现缺氧状态下保护组织细胞，减少缺氧性损害的功能。这一功能实现的基础在于HIF-lα的下游靶基因VEGF、EPO、葡萄糖转运蛋白(glucose transporters Glut, GLUT)和糖酵解相关酶己糖激酶1(hexokinase 1,

HK1)、己糖激酶3(hexokinase 3, HK3)、磷酸甘油酸激酶1(Phosphoglycerate Kinase 1, PGK1)、乳酸脱氢酶A(lactic dehydrogenase A, LDHA)、醛缩酶A(aldolase A,

ALDA）等在缺氧条件下的迅速活化，共同参与组织对缺氧的适应。目前已有大量报道显示，HIF-lα参与了包括脑、心、肝、肾等各种组织器官以及巨噬细胞、内皮细胞等不同类型细胞对缺氧的适应性应答。

HIF-2α是1997年由Tian等[50]克隆出的HIF家族新成员，又称为内皮PAS

蛋白-l(endothelial PAS protein-l, EPAS-1)、HLF(HIF-like factor)、HRF(HIF-related

factor)和MOP2(member of PAS superfamily 2). HIF-2α蛋白含有869个氨基酸残

基。HIF-lα与HIF-2α的氨基酸序列有48%的同源性，有很相似的结构域[51-53（] 图

1.2)。



图 1.2 HIF-lα与HIF-2α的结构对比示意图

HIF-lα与HIF-2α均含有bHLH/PAS, ODDDs, NADs, CADs区域，图中数据表示共有结构域的氨基酸相似性

Fig. 1.2 compared schematic of structure between HIF-1αand HIF-2α

HIF-1αand HIF-2αcontain the bHLH / PAS, ODDDs, NADs, CADs region, data represent domains of amino acid similarity in compared schematic

它们在N-端均含有bHLH结构域，介导与靶基因增强子或启动子上的HRE结合，

因两者bHLH的同源性达到99%，表明它们的DNA结合位点可能一致[54]。在C-端均具有保守的NAD和CAD转录激活结构域，NAD是HIF-1α和HIF-2α特异性调节不同靶基因时起主导作用的结构域[55]。HIF-2α的表达调节以蛋白质水平为主，缺氧同样是蛋白质水平上调节HIF-2α表达的主要因子。HIF-1α和HIF-2α都具备结合HRE 而启动靶基因表达的能力。两者存在一些共同的靶基因，如

VEGF、EPO、酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)、GLUT、白细胞介素6(interleukin, IL-6)、脂肪细胞分化相关蛋白(adipose differentiation-related protein,

ADPR）等[53,56-57]，HIF-1α和HIF-2α调节共同的靶基因，是在不同的组织或细胞、或是在不同的时相点、或是在不同的氧分压下起作用[58, 59]。HIF-1α和HIF-2α也能够特异性调节不同的靶基因[39, 60]。HIF-1α主要促进糖酵解相关酶基因、胰岛素样生长因子Ⅱ(Insulin-like growth factorⅡ, IGF-Ⅱ)、内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、血红素氧合酶

-1(heme oxygenase, HO-1)、诱导型NO合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等基因的表达[40, 61]；HIF-2α作用的靶基因主要涉及骨髓造血、血管生长、血管收缩、能量代谢、儿茶酚胺合成和铁代谢等方面。可见虽然HIF-1α和HIF-2α 拥

有高度的结构同源性，它们之间的功能并无冗余[62]，是以一种功能互补的方式发挥作用。这也说明，低氧条件下HIF-1α和HIF-2α以协同作用的方式，促进细胞对低氧的适应性，维持机体的氧平衡状态。

由此可见，STAT3、HIF-1α、HIF-2α作为氧信号转导系统的重要转录因子，对于调节细胞低氧适应性反应、维持机体氧平衡状态起着重要作用。我们推测

*stat3*、hif-1α、hif-2α基因可能在藏羚羊的高原低氧适应机制中也扮演重要角色。但是藏羚羊*stat3*、hif-1α、*hif-2α*cDNA的克隆及组织表达特征鲜为报道，这一部分却是藏羚羊低氧适应分子机制研究中的重要内容，故本研究以高海拔藏羚羊和藏系绵羊及低海拔绵羊为材料分析了*stat3*、hif-1α、hif-2α的组织表达情况和低氧适应性差异，进而揭示藏羚羊在自然生活条件下*stat3*、hif-1α、hif-2α基因的表达特征及其对该物种生存适应的生理意义，这也为诠释土著动物对高原特殊环境适应的分子机制提供依据，同时对于寻找加速高原低氧习服、防治高原疾病的措施具有一定的指导意义。

# 第二章 材料与方法

## **2.1** 材料

### 2.1.1 标本采集

经国家林业局批准（林护许准[2009] 46号），在青海省可可西里国家级自然保护区（海拔4300 m）捕获雄性藏羚羊5只和雄性藏系绵羊5只，在青海省民和县（海拔

1800m）获得雄性绵羊5只。均麻醉后行颈动脉放血处死，就地解剖迅速取所需组织投入液氮中，带回实验室低温保存备用。

### 2.1.2 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂名称 | 产地 |
| TRIzol RNA 提取试剂 | Invitrogen 公司 |
| TIANGENScript RT Kit | Tiangen 公司 |
| 2×Taq PCR MasterMix | Tiangen 公司 |
| BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit | Clontech 公司 |
| BD AdvantageTM 2 PCR Enzyme System Kit | Clontech 公司 |
| TIANgel Midi Purification Kit | Tiangen 公司 |
| 质粒小量提取试剂盒 | Tiangen 公司 |
| 限制性内切酶 *Eco*R I | Promega 公司 |
| pGEM-T Easy 载体 | Promega 公司 |
| JM109 感受态细胞 | Promega 公司 |
| DNase I (free-RNase) | TaKaRa 公司 |
| RNase A | TaKaRa 公司 |
| T4 DNA 连接酶 | Promega 公司 |
| IPTG | Tiangen 公司 |
| X-Gal | Tiangen 公司 |
| DEPC | Tiangen 公司 |
| SYBR Green PCR Master Mix | Bio-Rad 公司 |
| BCA Protein Assay Kit | Thermo 公司 |
| ft羊抗 HIF-1α 多克隆抗体 | Santa Cruz 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗ft羊 IgG | Santa Cruz 公司 |
| 兔抗 STAT3 多克隆抗体 | Santa Cruz 公司 |
| HRP 标记的ft羊抗兔 IgG | Santa Cruz 公司 |
| 小鼠抗 α-tubulin 单克隆抗体 | Santa Cruz 公司 |
| HRP 标记的ft羊抗小鼠 IgG | Santa Cruz 公司 |
| 其他试剂均为进口或国产产品 |  |

### 2.1.3 主要试剂配制

#### 2.1.3.1 主要培养基

##### （1) LB液体培养基：胰蛋白胨10g/l、酵母抽提物5g/l、NaCl 10g/l调节pH 为

7.0, 高压灭菌(15磅、20min)。

##### （2) LB平板培养基：胰蛋白胨10g/l、酵母抽提物5g/l、NaCl 10g/l、琼脂15g/l

调节pH为7.0，高压灭菌(15磅、20min)。

##### （3) LA液体培养基：LB液体培养基中加Amp，使之终浓度为80μg/ml。

(4) LA平板培养基：LB平板培养基中加Amp，使之终浓度为80μg/ml。

（5）双选择平板培养基：LA平板培养基中加入45μl X-gal（贮存浓度20mg/ml），涂布均匀。37℃培养至液体消失，放置4℃待用。

#### 2.1.3.2 其他试剂

（1）50×TAE Buffer：Tris 242g、冰醋酸57.1ml、EDTA 37.2g、加蒸馏水至1L，调节pH至8.5。

（2）1×TAE Buffer：10 ml 50×TAE Buffer加蒸馏水至1L。

（3）1%琼脂糖：1g琼脂糖溶于100ml 1×TAE中。

（4）IPTG(200mg/ml)：1g IPTG溶于5ml蒸馏水中，滤器过滤除菌，-20℃保存备用。

（5）30% (W/V)丙烯酰胺溶液：丙烯酰胺(Acr) 29g、甲叉双丙烯酰胺(Bis) 1g加超纯水，定容至100ml调整溶液pH值不超过7.0中，4℃避光保存。

（6）1.5M Tris·Cl(pH8.8)：Tris 18.2g，加超纯水至60ml溶解后，用浓盐酸调pH 至

8.8，最后用超纯水定容至100ml，高温灭菌后室温下保存。

（7）1.0M Tris·Cl(pH6.8)：Tris12.12g，加超纯水至60ml溶解后，用浓盐酸调pH

至6.8，最后用超纯水定容至100ml，高温灭菌后室温下保存。

（8）0.5M Tris·Cl(pH6.8): Tris 15.14g，加超纯水至200ml溶解后，用浓盐酸调pH至6.8，最后用超纯水定容至250ml，高温灭菌后室温下保存。(9) 10%SDS: SDS 10g加超纯水至100ml，50℃水浴下溶解，室温保存。(10) 10% AP: AP 0.1g，加超纯水至1ml溶解后，4℃保存一周。

(11) 10%PAGE分离胶(10ml): 30%Acr 3.3ml、1.5M Tris·Cl(pH8.8) 2.5ml、ddH2O

4.0ml、10%SDS 0.1ml、10%AP 0.1ml、TEMED 0.004ml临时配制。

（12）5%PAGE浓缩胶(5ml)：30%Acr 0.83ml、1.0M Tris·Cl(pH6.8) 0.63ml、ddH2O

3.4ml、10%SDS 0.05ml、10%AP 0.05ml、TEMED 0.005ml临用配制。(13) PAGE电泳液：甘氨酸10.82g、Tris 2.27g、SDS 0.75g加蒸馏水至750ml，临时配制。

（14）10×蛋白电泳缓冲液：Gly 2.9g、Tris 5.8g、SDS 0.37g，加超纯水1000ml。

（15）2×SDS加样缓冲液：0.5M Tris·Cl(pH6.8)、0.2Mβ-巯基乙醇、4%SDS、0.2%溴酚蓝、20%甘油，-20℃保存。 (16) 5×SDS上样缓冲液：0.5mol/L Tris·HCL 2.5ml、DTT 0.39g、SDS 0.5g、溴酚蓝0.025g，甘油2.5ml。

（17）SDS-PAGE Buffer: Tris 3.03g、Gly 18.77g、SDS 1.0g，蒸馏水1000ml. (18) 20%Tween20: Tween20 20ml，加超纯水至 100ml. (19) 10×TBS溶液：Tris 24.2g、NaCl 80g、蒸馏水1000ml，用盐酸调整pH值为

7.6.

（20）TBST缓冲液：1×TBS 700ml、20%Tween20 1.65ml，混匀后即可使用。

（21）封闭液：脱脂奶粉5g, TBST 100ml溶解后，4℃保存。

### 2.1.4 主要仪器设备

|  |  |
| --- | --- |
| 仪器名称 | 型 号 |
| 超低温冰箱 | Thermo Forma725（美国） |
| 超净工作台 | HD-1360 |
| 低温高速离心机 | Centrifuge 5417R, Eppendorf（德国） |
| PCR 扩增仪 | MJ Research PTC-250（美国） |
| 定量 PCR 仪 | iQ5, Bio RAD（美国） |

|  |  |
| --- | --- |
| 水平电泳仪 | DYY-Ⅲ稳压电泳仪，六一仪器厂（北京） |
| 恒温水浴锅 | HH-S11-1 型（北京） |
| 微量移液器 | Eppendorf（德国） |
| 紫外凝胶成像仪 | Labworks（英国） |
| 核酸蛋白检测仪 | Biophotometer, Eppendorf（德国） |
| 超纯水系统 | ELGA（英国） |
| 水浴摇床 | GFL (德国) |
| 空气浴摇床 | ZHWY-200B |
| 垂直电泳仪 | Bio RAD（美国） |
| iMark/xMark 酶标仪 | Bio RAD（美国） |
| Western 电泳转移系统 | Bio RAD（美国） |
| 微量加样器 | 上海注射器三厂（上海） |
| X-光片夹 | 蔚光医疗科技有限公司（河南） |
| 振荡器 | 江苏海门市麒麟医用仪器厂（江苏） |
| 封口机 | SF200/250（温州） |

### 2.1.5 主要分析软件

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| DNAstar | DNAMAN | Primer Premier 5.0 | CLUSTALX (1.81) |
| Chromas | Mega 4 | Image J |  |

### 2.1.6 主要在线分析程序

|  |  |
| --- | --- |
| BLAST | <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> |
| ORF Finder | <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> |
| Motif Scan | <http://www.expasy.org/prosite> |
| VecScreen | [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html) |
| SWISS-MOELD Server | [http://www.swissmodel.expasy.org](http://www.swissmodel.expasy.org/) |

## **2.2** 方法

### 2.2.1 技术路线



### 2.2.2 克隆策略

采用分段逐步扩增策略克隆藏羚羊*stat3*和*hif-1α*基因的cDNA序列。首先依据Genbank中已报道哺乳动物的*stat3*和*hif-1α*基因编码区序列设计兼并引物，扩增获得藏羚羊*stat3*和*hif-1α*基因高度保守的编码区部分序列，在此基础上设计下游片段的上游引物，而下游引物仍然由不同物种的保守序列设计而来，扩增出的片段与其相邻的上游片段之间形成了大约70-100bp的重叠区，利用DNAstar软件将已获得的不同编码区片段拼接，以此为基础，设计5′，3′RACE引物，分别扩增5′UTR，3′UTR。再次利用DNAstar软件将编码区片段、5′UTR和3′UTR拼接，得到*stat3*和*hif-1α*基因的cDNA序列。克隆策略与相应引物的位置如图

2.1和2.2所示。

为获得藏羚羊*hif-2α*基因的cDNA部分编码区序列，采用同源比对Genbank中已报道哺乳动物的*hif-2α*基因编码区序列的方法，设计兼并引物，利用RT-PCR方法扩增获得藏羚羊*hif-2α*基因高度保守的部分编码区序列。

此外，采用同源比对基因编码区序列设计兼并引物的方法，利用RT-PCR 技

术扩增获得藏系绵羊、低海拔绵羊*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*基因高度保守的部分编码区序列。

STPA

STAT3



**ST5R**

STPB



**STPC**

**ST3R**

图2.1 藏羚羊*stat3*基因cDNA克隆策略

Fig 2.1 Cloning strategy for Tibetan antelope's *stat3*

**H1α**

HIF-1α

**H1αASR** H1αSF



图2.2 藏羚羊*hif-1α*基因cDNA克隆策略

Fig 2.2 Cloning strategy for Tibetan antelope's hif-1α

### 2.2.3 引物的设计与合成

依据GenBank中已报道牛（*Bos Taurus*, NM\_001012671.2）、人（*Homo sapiens*，

NM\_139276.2）、小鼠(*Mus musculus*, NM\_213659.2)、大鼠（*Rattus norvegicus*, NM\_012747.2）和猪（*Sus scrofa*, DQ470570.1）的*stat3*编码区的保守序列，设计简并引物STPAf, STPAr; STPBf, STPBr; STPCf, STPCr分段扩增藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊*stat3*编码区序列。再根据编码区序列设计藏羚羊RACE特异性引物ST5r、ST3r. 依据获得的藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊*stat3*cDNA序列和

Genbank中已报道的绵羊(*Ovis aries* FJ970650.1) *stat3* CDS区部分序列，设计real-time PCR引物STrealf, STrealr（表2.1）。

依据GenBank中已报道牛（*Bos Taurus*, NM\_174339.3）、野牦牛（*Bos*

*grunniens*，AY621118.1）、人（*Homo sapiens*, NM\_001530.3）、类人猿（*Pongo abelii*，

NM\_001133503.1）、小鼠(*Mus musculus*, NM\_010431.2)、大鼠（*Rattus norvegicus*，

NM\_024359.1）和高原鼢鼠（*Eospalax baileyi*, DQ229099.1）的hif-1α编码区的

保守序列，设计简并引物H1αF、H1αR扩增藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊*hif-1α*中间片段序列。再根据中间片段序列设计藏羚羊RACE特异性引物H1αSF、

H1αASR. 依据获得的藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊*hif-1α*cDNA序列和GenBank中已报道的绵羊(*Ovis aries*, EΜ340260.1) *hif-1α*CDS区部分序列，设计Real-time PCR引物H1αrealF、H1αrealR（表2.2）。

依据GenBank中已报道牛（*Bos Taurus*, BC142229）、人（*Homo sapiens*，

NM\_001430)、野猪(*Sus scrofa*, NM\_001097420.1)、小鼠(*Mus musculus* ，

NM\_010137）和大鼠（*Rattus norvegicus*, NM\_023090）的hif-2α编码区的保守序列，设计简并引物H2αf、H2αr扩增藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊hif-2α的部分编码区序列。依据获得的藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊hif-2α部分编码区序列和GenBank中已报道的绵羊(*Ovis aries*, EU340261.1) *hif-2α*CDS区序列，设计Real-time PCR引物H2αrealf、H2αrealr（表2.3）。

用于Real-time PCR内参18SrRNA的引物为18Srealf和18Srealr[63]. 所用引物

（表2.1、表2.2和表2.3）均由上海英骏生物技术有限公司合成。引物使用浓度为10μmol /L。

表2.1 *stat3*的引物序列表

Table 2.1 primers sequences of*stat3*’s target genes for RT-PCR and Real-time PCR analysis

基因

Gene

GenBank

号

GenBank No.

克隆名称Clone name

引物名称Primer name

(F: Forwad, r: Reverse)

引物序列

Primers sequence (5′–3′)

退火温度Annealing temperature (oC)

产物大小product size (bp)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *stat3* STPaA STPaf CGGAGAAGCATTGTGAGTGA  STPaT STPar TCTTGGGATTGTTGGTCAGC 58 | | | | | | 826 |
| STPbA STPbf TTGTGATGCCTCCCTGATTG  STPbT STPbr CTGGGTCTTGCCGCTGATGT 58 | | | | | | 625 |
| STPcA STPcf CACCAAGCGAGGACTGAGCAT  STPcT STPcr CAGCACCTTCACCATTATTTC 54 | | | | | | 689 |
|  |  | STPcS  ST5R | ST5r | GTAGTGCTGCCCCATACCTGAAGAC | 68 | 2042 |
|  |  | ST3R | ST3r | CGTTCCACCACGAAGGCACT | 68 | 1256 |
| *stat3*  18SrRNA | FJ970650  *Ovis aries*  X01117  *Rattus norveg* | STreal  18Sreal  *icus* | STrealf STrealr 18Srealf  18Srealr | GGCTTCATCAGCAAGGAGAG TTGGTGTAAGGTTCCACTGACT GGTCTGTGATGCCCTTAGATGT  GCTTATGACCCGCACTTACTG | 60  60 | 167  178 |

STPaS STPbS

STPaf, STPar, STPbf, STPbr, STPcf, STPcr were designed for RT-PCR to get the partial CDS of *stat3* among Tibetan antelope(STPaA, STPbA, STPcA), Tibetan sheep(STPaT, STPbT, STPcT) and sheep(STPaS, STPbS, STPcS). ST5r, ST3r were designed for RACE to get the cDNA sequence of *stat3* in Tibetan antelope. STrealf, STrealr, 18Srealf, 18Srealr were designed from Real-time PCR

表2.2 *hif-1α*的引物序列表

Table 2.2 Primers sequences ofhif-1α’s target genes for RT-PCR and Real-time PCR analysis

| 基因  Gene | GenBank号  GenBank No. | 克隆名  称Clone name | 引物名  称Primer name (f: Forwad, r:  Reverse) | 引物序列  Primers sequence (5′–3′) | 退火温度  Annealing temperature (oC) | 产物大  小product size (bp) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| hif-1α |  | H1P | H1αf  H1αr | ATGCTTGGTGCTGATTTGTG  TTTCCTGCTCTGTTGGGTGA | 58 | 1400 |
|  |  | H15R | H1αSf | GAAGTCGGACAGCCTCACCCAA | 68 | 1700 |
|  |  | H13R | H1αASr | GGGTTCACAAATCAGCACCAAGC | 68 | 700 |
| hif-1α | EΜ340260.1  Ovis aries | H1real | H1αrealf H1αrealr | TTGTGACCATGAGGAAATGAGA TTCCATGTTGCAGATTTTATGTT | 60 | 156 |
| 18S rRNA | X01117  Rattus norvegicus | 18Sreal | 18Srealf 18Srealr | GGTCTGTGATGCCCTTAGATGT GCTTATGACCCGCACTTACTG | 60 | 178 |

H1αf, H1αr were designed for RT-PCR to get the partial CDS of *hif-1α*among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep. H1αSf, H1αASr were designed for RACE to get the cDNA sequence of *hif-1α*in Tibetan antelope. H1αrealf, H1αrealr, 18Srealf, 18Srealr were designed from Real-time PCR.

表2.3 *hif-2α*的引物序列表

Table 2.3 Primers sequence ofhif-2α’s target genes for RT-PCR and Real-time PCR analysis

| 基因  Gene | GenBank号  GenBank No. | 克隆  名称Clone name | 引物名称  Primer name (f:  Forwad, r: Reverse) | 引物序列  Primers sequence (5′–3′) | 退火温度  Annealing temperatu re (oC) | 产物大  小product size (bp) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| hif-2α |  | H2PA H2PT  H2PS | H2αf H2αr | ACTTCACTCATCCCTGCGACCAT CCACTTACCACCTGACCCTTG |  |  |
|  | 58 | 517 |
| hif-2α | EU340261.1  Ovis aries | H2real | H2αrealf  H2αrealr | CCTACTGCGACGACAGAATCA  GTTCTGGTGGCTTTTGGTCA | 60 | 122 |
| 18S rRNA | X01117  Rattus norvegicus | 18Sre al | 18Srealf 18Srealr | GGTCTGTGATGCCCTTAGATGT GCTTATGACCCGCACTTACTG | 60 | 178 |

H2αf, H2αr, were designed for RT-PCR to get the partial CDS of *hif-2α*among Tibetan antelope(H2PA), Tibetan sheep(H2PT) and sheep(H2PS). H2αrealf, H2αrealr, 18Srealf, 18Srealr were designed from Real-time PCR.

### 2.2.4 实验方法

#### 2.2.4.1 样品

所用样品为-80℃低温保存的藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌组织。

#### 2.2.4.2 所用样品总RNA的提取

#### 2.2.4.2.1 操作环境的清洁

实验台、移液器（架）等用75%乙醇擦拭；玻璃器皿及金属器械常规清洗后，

250℃烘烤4h以上；使用无DNase和RNase的塑料制品；溶液加DEPC至终浓度

0.1%，室温处理过夜，次日高压处理30min；不能高压的溶液需用DEPC处理过的灭菌水溶解新开封的试剂进行配制。

#### 2.2.4.2.2 总RNA提取

按照TRIzol试剂盒说明提取总RNA，其步骤如下：

（1）组织匀浆：取约50mg-100mg组织放入匀浆器中，加入1ml TRIzol迅速匀浆。将匀浆液转移至1.5ml的EP管中，4℃12, 000g离心10min，以去除不溶物及上层油脂，中间澄清液转移至新EP管，室温孵育5min以解离核蛋白复合体；

（2）各相分离：按0.2ml氯仿/1mlTRIzol的比例加入氯仿，充分振荡混匀30秒，室温孵育2-3min，4℃12, 000g离心15min；

(3) RNA沉淀：转移上清（勿触及中间层）至一新EP管，按0.5ml异丙醇/1mlTRIzol的比例加入异丙醇，颠倒混匀，室温孵育10min，4℃12, 000g离心10min以沉淀RNA；

(4) RNA漂洗：弃上清，按1ml 75%乙醇（DEPC处理水配制）/1mlTRIzol的比例，加入75%的乙醇漂洗RNA沉淀，4℃7500g离心沉淀5min，弃上清；

（5）重复(4)；

（6）RNA溶解：自然干燥RNA沉淀5-10min，加入适量DEPC处理水溶解RNA

沉淀，于-80℃保存备用。

#### 2.2.4.3 RNA中基因组DNA的去除

（1）按下列反应体系加入各反应组分：

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| Total RNA (20-50μg) 10 × DNase I Buffer  DNase I (RNase-free) (5U/μl) RNase Inhibitor (40U/μl) Nuclease-Free Water  Total | X 5.0  2.0  1.0  Y 50.0 |

（2）37℃孵育30min，加入50μl DEPC处理水；

（3）加入100μl（等量）苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1），充分振荡混匀，12, 000g，室温离心5min；

（4）取上清，加入等量氯仿/异戊醇（24:1），充分振荡混匀，12, 000g，室温离心5min；

（5）取上清，加入1/10体积的3M Na2AC(pH5.2)以及2.5倍体积的冰冷无水乙醇，

-20℃放置1h，12,000g，室温离心15min；

（6）弃上清，加入70%的冰冷乙醇（DEPC处理水配制）漂洗沉淀，充分混匀后，

7,500g离心5min；

（7）弃上清，自然干燥RNA沉淀5-10min，加入适量DEPC处理水溶解RNA沉淀后，进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳，检测RNA的完整性。

#### 2.2.4.4 RNA质量鉴定

#### 2.2.4.4.1 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

（1）电泳槽及梳子的预处理

用洗涤剂清洗电泳槽、制胶模具及梳子，用水彻底冲洗干净后，无水乙醇擦拭以使水分充分挥发，用3%双氧水溶液填充浸泡上述物品10min，然后用0.1%

DEPC处理水彻底冲洗干净后备用；

（2）制备1.2%变性琼脂糖凝胶

称量0.48g琼脂糖加DEPC处理水25.2ml，加5×MOPS电泳缓冲液4ml，加热使溶解，稍冷却加入3.4ml甲醛后混匀，在化学通风橱内灌制凝胶，室温放置30min；

（3）RNA电泳检测样品的制备

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| RNA | 2.0 |
| 甲醛 | 2.5 |
| 甲酰胺 | 7.5 |
| 10 × MOPS 电泳缓冲液 | 2.0 |
| RNA loading Buffer  灭菌的 DEPC 水 | 2.0  4.0 |

（4）混匀并离心，放于65℃温育5min后，置于冰上；

（5）将制好的凝胶放入水平电泳槽中，加入1×MOPS电泳缓冲液，上样，在5V/cm

条件下电泳30min；

（6）电泳结束后，在紫外凝胶成像系统中观察提取的RNA质量。

#### 2.2.4.4.2 RNA浓度和纯度测定

取1μl RNA溶液加入99μl DEPC水混匀，用紫外分光光度计测定A260/A280

的比值和浓度。

#### 2.2.4.5 cDNA第一链合成

（1）按照TIANGENScript RT Kit说明逆转录合成cDNA第一链，在200μl的EP管中加入5μg总RNA，然后加入2μl oligo(dT) 15(10μM)和2μl dNTP(2.5μM each), 补RNase-free ddH2O定容至14.5μl；

##### （2）70℃加热上述混合物5min后迅速在冰上冷却2min，短暂离心收集反应液后按以下反应体系逐一加入各组分；

##### （3）反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| 5×First -Strand Buffer | 4.0 |
| RNasin | 0.5 |
| TIANScipt M-MLV | 1.0 (200U) |

##### （4）42℃温浴50min；

##### （5）95℃加热5min灭活反转录酶，-20℃备用保存。

#### 2.2.4.6 PCR反应扩增目的基因片段

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| Template cDNA | 1.0 |
| 引物 f (10μM) | 1.0 |
| 引物 r (10μM) | 1.0 |
| 2×Master Mix | 12.5 |
| ddH2O | 补至 25.0 |

（1）按以下反应体系逐一加入各组分：

（2）进行梯度PCR反应，每反应管的退火温度按1℃比例递增，共完成10个反应管，反应的循环参数为：94℃变性3min；94℃30秒，50℃-60℃30秒，72℃1-2min，30个循环；72℃延伸10min。

（3）行1%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定PCR产物，利用紫外凝胶成像系统分析电泳结果，然后选择最佳退火温度，进行50μl反应体系的PCR扩增，并纯化、回收扩增产物。

#### 2.2.4.7 RACE扩增目的基因的3′末端和5′末端序列

参照BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 以及BD PCR Enzyme

System使用说明，完成目的基因的3´末端和5´末端序列的扩增，具体操作如下：

#### 2.2.4.7.1 第一链cDNA合成

（1）取0.2ml EP管，按以下反应体系制备5′RACE和3′RACE模板；

5′RACE Ready cDNA

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| Total RNA (50ng-1μg) 5´-CDS primer (12μM)  BD SMARTⅡA oligo (12μM) Nuclease-Free Water  Total | X 1.0  1.0  Y 5.0 |

3′RACE Ready cDNA

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| Total RNA (50ng-1μg) 3´-CDS primer (12μM) Nuclease-Free Water Total | X 1.0  Y 5.0 |

（2）轻轻混匀，短暂离心；

（3）70℃孵育2min后，迅速冰浴2min，短暂离心；

（4）在每管中分别加入下列组分：

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| 5 × First -Strand Buffer DTT (20mM)  DNTP Mix (10mM)  BD PowerScript Reverse Transcriptase Total | 2.0  1.0  1.0  1.0  10.0 |

（5）轻轻混匀，短暂离心；

（6）42℃孵育1.5小时；

（7）将反应液稀释后于72℃加热7min后，-20℃保存备用。

#### 2.2.4.7.2 RACE扩增cDNA末端序列

##### （1）按以下反应体系配制Master Mix溶液；

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| PCR-Grade Water  10 × BD Advantage 2 PCR Buffer dNTP Mix (10mM each)  50 BD Advantage 2 Polymerase Mix Total | 34.5  5.0  1.0  1.0  41.5 |

##### （2）轻轻混匀，短暂离心；

##### （3）将Master溶液与下列试剂混合至总体积50μl；

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| 5´RACE Ready cDNA (3´RACE Ready cDNA) UPM (10 × )  GSP1 (10μM)  Master Mix Total | 2.5  5.0  1.0  41.5  50.0 |

（4）扩增参数为：94℃30s，72℃3min，5个循环；94℃30s，70℃30s，72℃3min，

5个循环；94℃30s，68℃30s，72℃3min，25个循环，扩增产物于4℃保存。

#### 2.2.4.8 目的片段的回收纯化

参照TIANgel Midi Purification Kit使用说明回收纯化目的基因片段，具体操作如下：

（1）将500μl平衡液加入吸附柱CA2中（吸附柱放入收集管中），12, 000rpm离心1min，弃废液； （2）将单一的目的DNA条带从琼脂糖凝胶中切下，放入干净的离心管中，称取重量；

（3）向胶块中加入3倍体积溶胶液PN，50℃水浴放置10min，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解；

（4）将上一步所得溶液加入到吸附柱CA2 中，室温放置2min, 12, 000rpm 离心

1min，弃废液。

（5）向吸附柱CA2中加入600μl漂洗液PW，12,000rpm离心1min，弃废液；

（6）重复操作步骤（5）；

（7）将吸附柱CA2放回收集管，12, 000rpm离心2min，尽量除尽漂洗液，将吸附柱CA2置于室温放置数分钟，彻底地晾干；

（8）将吸附柱CA2放到一个干净离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液EB，室温放置2min, 12, 000rpm离心2min收集DNA溶液；

（9）取5μl收集的DNA溶液，进行琼脂糖电泳检测其纯度。

#### 2.2.4.9 连接反应

参照Promega公司PGEM-T Easy Vector试剂盒的操作指南，进行连接反应。

（1）在微量离心管中配制下列溶液：

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| 2×Rapid Ligation Buffer PGEM-T Easy Vector(50ng) PCR product  T4 DNA Ligase(3Weiss units/μl) Total | 5.0  1.0  X 1.0  10.0 |

（2）混匀后，4℃孵育过夜。

#### 2.2.4.10 感受态细胞的转化

（1）预先将LA平板培养基在37℃孵育箱中预热10min；

（2）将16μl的X-Gal贮存液(50mg/ml)及40μl IPTG溶液(100mM)均匀涂在预热后的

LA平板上，置37℃孵育30min，以促进吸收；

（3）取冻存感受态细胞50μl，冰浴融化，加入目的DNA，轻轻旋转混匀内容物，冰浴放置30min；

（4）迅速将PE管放到42℃水浴中静置60s。

（5）迅速冰浴冷却2min；

（6）每管加入500μl的LB液体培养基，置于37℃振荡培养1小时，使细菌复苏并表达抗生素的抗性基因；

（7）取100μl已转化的感受态细胞均匀涂布于LA平板培养基上；

（8）将平板置于37℃直至液体吸收后，倒置平板，于37℃培养12小时。

#### 2.2.4.11 重组质粒菌落鉴定

#### 2.2.4.11.1 PCR鉴定

用Tip尖挑取LA平板上的单克隆白色菌落，加入50μl去离子水，充分混匀，

100℃煮沸10min，4000rpm离心5min，轻轻吸取上清2μl作为插入片段鉴定的PCR模板，PCR反应引物采用载体内侧引物进行扩增，另外对每一个阳性克隆，用各自最初的RT-PCR的反应引物建立扩增体系。

#### 2.2.4.11.2 重组质粒制备

参照TIANprep Mini Plasmid Kit使用说明，具体制备重组质粒。操作如下：

（1）向吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）加入500μl的平衡液BL，12, 000rpm离心1min，弃废液；

（2）取1-5 ml过夜培养的菌液，加入离心管中，12, 000 rpm离心1分钟，弃上清；（3）向留有菌体沉淀的离心管中加入250μl溶液P1，使用涡旋振荡器彻底悬浮细菌

沉淀；

（4）向离心管中加入250μl溶液P2，温和地上下翻转6－8次使菌体充分裂解；

（5）向离心管中加入350μl溶液P3，立即温和地上下翻转6-8次，充分混匀，出现白色絮状沉淀，12, 000 rpm离心10分钟，此时在离心管底部形成沉淀；

（6）将上清液用移液器转移到吸附柱CP3中，注意尽量不要吸出沉淀。12, 000 rpm

离心60min，弃废液，将吸附柱CP3放入收集管中；

（7）向吸附柱CP3中加入500μl去蛋白液PD，12, 000 rpm离心60min，弃废液，将吸附柱CP3重新放回收集管中；

（8）向吸附柱CP3中加入600μl漂洗液PW，12, 000 rpm离心60min，弃废液，将吸附柱CP3重新放回收集管中；

（9）重复操作步骤（8）；

（10）将吸附柱CP3放入收集管中，12,000 rpm离心2min；

（11）将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加50μl洗脱缓冲液EB，室温放置2min, 12, 000rpm离心2min将质粒溶液收集到离心管中。

#### 2.2.4.11.3

酶切鉴定重组质粒建立酶切反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分  Component | 体积  Volume(µl) |
| *Eco*R I  10 × buffer Recombinant plasmid ddH2O  Total | 1.0  2.0  x y 20.0 |

轻轻混匀，置37℃水浴保温1.5小时，取酶切反应产物5μl，上样到1.0%琼脂糖凝胶电泳中进行分析。

#### 2.2.4.12 测序

测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

#### 2.2.4.13 序列分析

用VecScreen软件筛除所测序列两端的载体序列和RACE时添加在末端的接头。用BLAST程序检索GenBank数据库，确定所获片段序列是否正确。根据序列之间的重叠区，利用DNAstar软件对序列进行拼接。利用ORF Finder或DNAstar

软件寻找开放读码框。利用CLUSTALX软件对编码区氨基酸序列进行多重比对。

Motif软件对其进行功能域预测。利用SCRATCH服务器进行二级结构预测。

#### 2.2.4.14 荧光定量PCR检测mRNA的表达

利用TIANGENScript RT Kit逆转录合成cDNA第一链，以此为模板，进行荧光定量PCR，其反应步骤如下：

##### （1）目的基因和18srRNA扩增效率的判断

对各检测组织的cDNA设置10-1、10-2、10-3、10-4、10- 5 5个稀释梯度，获得目的基因和18srRNA不同浓度梯度的Ct值，通过cDNA浓度梯度的log值对△Ct值作图，所得直线斜率绝对值接近于0，说明目的基因和18srRNA的扩增效率相同，可以通过△△Ct方法[64]进行相对定量分析；

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应组分  Component | 浓度  Concentration(µM) | 体积  Volume(µl) |
| SybrGreen qPCR Master Mix  引物 f (10uM) 引物 r (10uM) ddH20  Template (cDNA) Total | 2x 10.0  10.0 | 12.5  0.5  0.5  9.5  2.0  25.0 |

##### （2）建立实时定量PCR反应体系

（3）PCR扩增参数为：95℃2min，95℃10s，60℃10s，72℃45s，40个循环；最后以每10s上升0.5℃的速度从60℃到95℃记录熔解曲线；

（4）把加好样品的96孔板放在Bio-Rad iQ5 Gradient Real-Time PCR仪中进行反应；

（5）反应完成后，得到所有标本的记录点曲线，软件自动进行数据分析，调整基线，计算出达到阈值的最低循环数Threshold cycle(Ct值)，以Ct值来计算标本中目的基因的mRNA拷贝数。每个基因均重复测量三次，Ct取其均值进行比较及相应的统计分析。为比较组间基因表达量的差异，采用如下的计算：

△Ct=Ctgene-Ct18srRNA

△△Ctl=△Ct-△CtNeo group

Fold change(relative quantification) =2一△△Ct

#### 2.2.4.15 Western-blot检测蛋白质的表达

（1）取约1g组织放入匀浆器中，加入RIPA缓冲液3ml、PMSF(10 mg/ml) 30μl，冰上孵育30 分钟后，匀浆；

（2）转移入离心管20, 000 g，4℃，15分钟；

（3）取上清液，分装-20℃保存；

（4）参照BCA蛋白定量试剂盒说明，测定总蛋白质浓度；

（5）参照《现代分子生物学实验技术》配制SDS-PAGE胶，5%积层胶，10%分离胶，并配置1×SDS Tris -甘氨酸电泳缓冲液；

（6）取40μg各组织蛋白样品，加入5×SDS上样缓冲液于100℃水浴煮沸5min，上样电泳（浓缩胶电压80V，分离胶电压100V）；

（7）电泳完毕后，将凝胶放入预冷的电转缓冲液中平衡5min。依凝胶大小，裁剪大小相同的厚滤纸和PVDF膜，甲醛激活PVDF膜后在预冷的电转缓冲液中平衡5min；

（8）采用半干式电转方法恒流25mA，转移约15-30min；

（9）电转结束后，将膜置于TBS中漂洗3次，每次5min；

（10）将转印膜放入杂交袋内，加入适量封闭液，室温轻摇2小时；

（11）将目的蛋白及内参照的PVDF膜分开，按照0.1ml/cm2的比例分别加入用封闭液稀释的一抗，除尽气泡，封口，4度轻摇过夜；

（12）取出转印膜，用TBS-T漂洗5次，每次10min；

（13）将转印膜放入杂交袋内，按照0.1ml/cm2的比例加入HRP标记的二抗，赶除气泡后封口，在室温振荡1小时；

（14）取出转印膜，用TBS-T漂洗5次，每次10min；

（15）取适当大小保鲜膜平铺于试验台上，将化学发光试剂盒中A和B液按等体积混合，将PVDF膜蛋白面与此混合液充分接触，包裹PVDF膜，暗室压片，胶片显影、定影，观察并记录实验结果。

# 第三章 实验结果

## **3.1** 肺、肝、肾、心肌和骨骼肌组织总**RNA**提取

采用TRIzol一步法从藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌组织中提取总RNA，测定上述三种动物五种组织的A260/A280在1.8～1.9之间。琼脂糖电泳显示18S、28S条带清晰（图3.1.1, 图3.1.2和图3.1.3），提示所提取各组织总RNA的完整性和纯度较好，可作为逆转录的模板。



图3.1.1 藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌总RNA电泳图

Fig 3.1.1 electropheresis of lung(L), liver(Li), kidney(K), cardiac muscle(CM) and skeletal musle(SM) total RNA of Tibetan antelope



图3.1.2 藏系绵羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌总RNA电泳图

Fig 3.1.2 electropheresis of lung(L), liver(Li), kidney(K), cardiac muscle(CM) and skeletal musle(SM) total RNA of Tibetan sheep



图3.1.3 低海拔绵羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌总RNA电泳图

Fig 3.1.3 electropheresis of lung(L), liver(Li), kidney(K), cardiac muscle(CM) and skeletal musle(SM) total RNA of sheep

## **3.2** 目的基因的**PCR**扩增及测序结果分析

### 3.2.1 藏羚羊*stat3*基因的cDNA获得及序列分析

以藏羚羊心肌组织总RNA为模板，经RT-PCR扩增分别得到*stat3*的826bp、

625bp、689bp三部分编码区片段，利用DNAstar软件拼接得到1593 bp的*stat3*中间片段，经3′RACE PCR和5′RACE PCR分别得到2042bp和1256bp的*stat3*两端（图3.2.1.1），将获得的三段序列经DNAstar拼接后，去除重叠序列得到4288bp

*stat3*基因的cDNA序列，该序列包含2312bp的开放阅读框、29bp的5′UTR区和1947bp的3′UTR区。其3′UTR区具有脊椎动物典型的加尾信号AATAAA 和

29bp的Poly A尾巴。此序列已提交到GenBank, 获得登录号为JF267357。藏羚羊*stat3* cDNA的开放阅读框编码770个氨基酸。预测蛋白质分子量约为88 kDa，

pI为6.22，包含氨基末端结构域(amino-terminal domain, NH2)、螺旋-螺旋结构域(coiled-coiled domain, CCD)、DNA结合域(DNA-binding domain, DBD)、SH2结构域(Src-homology-2 domain, SH2)等保守氨基酸序列。拓扑结构预测显示该蛋白上有39个潜在的功能位点：4个N-糖基化位点(N-glycosylation site)(192NQSV,401NGSL, 538NYSG,647NMSF)，11个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site)(181SqgD,208TalD,226SamE,234TltD,

236TdeE,269SlaE,412TlrE,527TlaE,613SskE,622TwvE,649SfaE), 11个N -肉豆蔻

酰化位点(N-myristoylationsite)(126GGqaNH,190GNnqSV,223GLlsAM, 253GGppNI,342GVqfTT,402GSlsAE,421GGraNC,536GVnySG,541GCqiTW,618GV

tfTW,750GQfeSL)，12蛋白激酶C磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation

Site )(138TeK,178TlK,292SyK,346TtK,381SrK,412TlR,515TtK,516TkR,599StK,613

SsK,629SgK,727SpR)，1个酪氨酸激酶磷酸化位点(Tyrosine kinase phosphorylation

site）(354KfpElnY)。这与GenBank中已报道的其它哺乳动物的STAT3在二级结构和潜在功能位点上相一致（图3.2.1.2）。

利用DNAMAN软件将藏羚羊*stat3*基因的编码区序列和氨基酸序列与已报道哺乳类的*stat3*进行相似性比较（图3.2.1.3,表3.2.1.1）。结果表明，藏羚羊*stat3*与哺乳类*stat3*具有较高的相似性，为86% ~ 98%左右，其中与牛的*stat3*序列高度相似，达到98.06%以上。根据STAT3的氨基酸序列，利用Mega 4.1软件的NJ方法构建哺乳类STAT3的分子进化树(图3.2.1.4)，STAT3进化树与传统的物种系统进化关系基本一致，藏羚羊与牛归为一支。上述结果表明本实验所克隆的序列为藏羚羊*stat3*的cDNA序列。

(1)



(2)



图3.2.1.1 藏羚羊*stat3*基因RT-PCR及RACE PCR电泳图

Fig.3.2.1.1 Products of RT-PCR and RACE PCR of *stat3* cDNA from Tibetan antelope separated on gel. (1) (A) 826bp product from coding region of the cDNA. (B) 625bp product from coding region of the cDNA. (c) 689bp product from coding region of the cDNA. (2)(A) 1256bp product from 5′ end of cDNA. (B) 2042bp product from 3′ end of cDNA.

T

2 A T C A C G C A G A G T A C A T G G G C C A G C A G A A T G C C C A A T G G A A T C A G G C T C C A A C A G

1 M P N G I R L Q Q

5 6 C T G G A C A C A C G G T A C T T G G A G C A G C T C C A T C A G C T G T A C A G T G A C A G C T T C C C C

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 0 | L | D | T | R | Y | L | E | Q | L | H | Q | L | Y | S | D | S F P | | |
| 1 1 0 | A T G | A G C | T G C | G G G | C A G | T T T | C T G | G C C | C C T | T G G | A T C | G A G | A G T | C A A | G A T | T G G G C A T A T | | |
| 2 8 | M | S | C | G | Q | F | L | A | P | W | I | E | S | Q | D | W A Y | | |
| 1 6 4 | G C G | G C C | A G C | A A A | G A A | T C A | C A C | G C G | A C T | T T G | G T G | T T T | C A T | A A C | C T C | T T G G G A G A A | | |
| 4 6 | A | A | S | K | E | S | H | A | T | L | V | F | H | N | L | L G E | | |
| 2 1 8 | A T T | G A C | C A A | C A G | T A T | A G C | C G C | T T C | C T G | C A A | G A G | T C C | A A T | G T T | C T C | T A T C A G C A C | | |
| 6 4 | I | D | Q | Q | Y | S | R | F | L Q | | E | S | N | V | L | Y | Q | H |
| 2 7 2 | A A T | T T G | C G A | A G A | A T C | A A G | C A G | T T C | C T T C A G | | A G C | A G A | T A C | C T T | G A G | A A G | C C A | A T G |
| 8 2 | N | L | R | R | I | K | Q | F | L Q | | S | R | Y | L | E | K | P | M |
| 3 2 6 | G A G | A T T | G C C | C G A | A T T | G T G | G C C | C G T | T G C C T G | | T G G | G A A | G A G | T C C | C G C | C T C | C T C | C A A |
| 1 0 0 | E | I | A | R | I | V | A | R | C L | | W | E | E | S | R | L | L | Q |

3 8 0 A C T G C A G C C A C T G C A G C C C A G C A A G G G G G C C A G G C C A A C C A C C C C A C A G C C G C C

1 1 8 T A A T A A Q Q G G Q A N H P T A A

***N-myristoylation site(126-131)***

4 3 4 G T G G T G A C A G A G A A G C A G C A G A T G C T G G A G C A G C A C C T G C A G G A C G T C C G C A A G

1 3 6 V V T E K Q Q M L E Q H L Q D V R K

***PKC(138-140)***

4 8 8 C G T G T C C A G G A T C T A G A A C A G A A G A T G A A A G T G G T A G A G A A T C T C C A G G A T G A T

1 5 4 R V Q D L E Q K M K V V E N L Q D D

5 4 2 T T C G A T T T C A A C T A T A A A A C C C T C A A G A G T C A A G G A G A C A T G C A A G A T C T G A A T

1 7 2 F D F N Y K T L K M Q D L N

S Q G D

***PKC(178-180)*** Ck-2(181-184)

5 9 6 G G A A A C A A C C A A T C G G T G A C C A G G C A G A A G A T G C A G C A G C T G G A A C A G A T G C T T

1 9 0 G N N Q S V T R Q K M Q Q L E Q M L

***N-myristoylation site(190-195) N-glycosylation site(192-195)***

6 5 0 A C T G C C C T G G A C C A G A T G C G G C G C A G C A T C G T G A G T G A G C T G G C G G G G C T T T T G

2 0 8 Q M R R S I V S E L A G L L

T A L D

***Ck-2(208-231)*** N-myristoylation ***site(223-228)***

7 0 4 T C A G C A A T G G A G T A T G T G C A G A A A A C T C T C A C G G A T G A A G A A T T G G C A G A C T G G

S A M E

T L T D E E

2 2 6

Y V Q K

L A D W

***Ck-2(226-229)*** Ck-2(234-237) Ck-2(236-239)

7 5 8 A A G A G G C G A C A A C A G A T T G C T T G C A T T G G A G G C C C T C C C A A C A T C T G C C T A G A T

2 4 4 K R R Q Q I A C I G G P P N I C L D

***N-myristoylation site(253-258)***

8 1 2 C G G C T A G A A A A C T G G A T A A C C T C A T T A G C A G A A T C T C A G C T T C A G A C C C G C C A A

2 6 2 R L E N W I T S Q L Q T R Q

S L A E

***Ck-2(269-272)***

8 6 6 C A A A T T A A G A A A C T G G A G G A G C T G C A G C A G A A G G T T A G C T A C A A A G G G G A C C C C

2 8 0 Q I K K L E E L Q Q K V S Y K G D P

***PKC(292-294)***

9 2 0 A T T G T A C A G C A C C G G C C A A T G C T G G A G G A G A G A A T C G T G G A G C T G T T T A G A A A C

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 9 8 | I | V | Q | H | R | P | M | L | E E | R I | V |
| 9 7 4 | T T A | A T G | A A A | A G T | G C C | T T C | G T G | G T G | G A A C G G | C A G C C C | T G C |
| 3 1 6 | L | M | K | S | A | F | V | V | E R | Q P | C |
| 1 0 2 8 | G A C | C G G | C C A | T T A | G T C | A T C | A A G | A C C | G G T G T C | C A G T T C | A C A |

E L F R N A T G C C T A T G C A T C C T M P M H P

A C T A A A G T C A G A T T G 3 3 4 D R P L V I K T G V Q F T T K V R L

***N-myristoylation site(342-347)*** PKC(346-348)

1 0 8 2 C T G G T T A A A T T C C C T G A G C T A A A T T A T C A A C T T A A A A T T A A A G T G T G C A T T G A C

3 5 2 L V K F P E L N Y Q L K I K V C I D

***Tyrosine kinase phosphorylation site (354-360)***

T C C G G G G A T G T T G C A G C G C T C A G A G G G T C C C G G A A A T T T A A C A T T C T G S G D V A A L R G S R K F N I L

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 1 3 6 | A A A | G A C |
| 3 7 0 | K | D |

***PKC(381-383)***

1 1 9 0 G G C A C A A A C A C G A A A G T G A T G A A C A T G G A A G A G T C T A A C A A T G G C A G C C T C T C A

3 8 8 G T N T K V M N M E E S N N G S L S

***N-glycosylation site(401-404)***

1 2 4 4 G C G G A G T T C A A G C A C T T G A C C C T G A G A G A G C A G A G A T G C G G T A A T G G G G G C C G A

4 0 6 A E F K H L Q R C G N G G R

T L R E

***N-myristoylation site(402-406)*** PKC(412-414) Ck-2(412-415) N-myristoylation ***site(421-426)***

1 2 9 8 G C C A A T T G T G A T G C C T C C C T G A T T G T G A C C G A G G A G C T G C A C C T G A T C A C C T T T

4 2 4 A N C D A S L I V T E E L H L I T F

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 3 5 2 | G A G | A C T | G A G | G T G | T A T | C A C | C A A | G G C | C T C | A A G | A T C | G A C | C T G | G A G | A C G | C A C | T C A | T T G |
| 4 4 2 | E | T | E | V | Y | H | Q | G | L | K | I | D | L | E | T | H | S | L |
| 1 4 0 6 | C C A | G T G | G T G | G T G | A T C | T C C | A A C | A T C | T G T | CA G | A T G | C C C | A A C | G C C | T G G | G C G | T C C | A T C |
| 4 6 0 | P | V | V | V | I | S | N | I | C | Q M P N A W A S I | | | | | | | | |
| 1 4 6 0 | C T A | T G G | T A C | A A C | A T G | C T G | A C C | A A C | A A C | C C C A G G A A C G T G A A C T T T T T C A C C A A A | | | | | | | | |
| 4 7 8 | L | W | Y | N | M | L | T | N | N | P R N V N F F T K | | | | | | | | |
| 1 5 1 4 | C C C | C C G | A T C | G G A | A C G | T G G | G A T | C A A | G T G | G C C G A G G T G C T G A G C T G G C A G T T C T C C | | | | | | | | |
| 4 9 6 | P | P | I | G | T | W | D | Q | V | A E V L S W Q F S | | | | | | | | |
| 1 5 6 8 | T C T | A C C | A C C | A A G | C G C | G G G | C T G | A G C | A T C | G A G C A G T T G A C G A C G C T G G C G G A G A A A | | | | | | | | |

5 1 4 S T T K R G L S I E Q L T K

T L A E

***PKC(515-517) PKC(516-518)*** Ck-2(527-530)

G G A C C T G G T G T G A A C T A T T C A G G G T G T C A G A T C A C A T G G G C T A A A T T T G P G V N Y S G C Q I T W A K F

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 6 2 2 | C T C | T T A |
| 5 3 2 | L | L |

***N-myristoylation site(536-540)*** N-glycosylation site(538-541) N-myristoylation ***site(540-544)***

1 6 7 6 T G C A A A G A A A A C A T G G C T G G C A A G G G C T T C T C C T T C T G G G T C T G G C T G G A C A A C

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5 5 0 | C | K | E | N | M | A | G | K | G | F | S | F | W | V | W | L | D | N |
| 1 7 3 0 | A T C | A T T | G A C | C T G | G T G | A A A | A A G | T A C | A T C | C T G | G C C | C T T | T G G | A A C | G A A | G G G | T A T | A T A |
| 5 6 8 | I | I | D | L | V | K | K | Y | I | L | A | L | W | N | E | G | Y | I |

1 7 8 4 A T G G G C T T C A T C A G C A A G G A G A G G G A A C G G G C C A T C T T G A G C A C T A A G C C C C C A

5 8 6 M G F I S K E R E R A I L S T K P P

***PKC(599-602)***

1 8 3 8 G G C A C C T T C C T G C T G A G A T T C A G T G A A A G C A G C A A A G A A G G A G G A G T C A C C T T C

6 0 4 G T F L L R F S E G G V T F

S S K E

***PKC(613-729) Ck-2(613-615)*** N-myristoylation ***site(618-622)***

1 8 9 2 A C C T G G G T G G A G A A G G A C A T C A G T G G C A A G A C C C A G A T C C A G T C A G T G G A A C C T

6 2 2 K D I S G K T Q I Q S V E P

T W V E

***Ck-2(622-625)*** PKC(629-631)

1 9 4 6 T A C A C C A A G C A G C A G C T G A A C A A C A T G T C A T T T G C T G A A A T C A T C A T G G G C T A T

6 4 0 Y T K Q Q L N I I M G Y

N

M

S

F

A

E

***N-glycosylation site(647-650) Ck-2(649-652)***

2 0 0 0 A A G A T C A T G G A T G C C A C C A A T A T C C T G G T G T C T C C G C T G G T C T A T C T C T A C C C T

6 5 8 K I M D A T N I L V S P L V Y L Y P

2 0 5 4 G A C A T T C C A A A G G A G G A G G C A T T C G G A A A G T A C T G T C G G C C G G A G A G C C A G G A G

6 7 6 D I P K E E A F G K Y C R P E S Q E

2 1 0 8 C A T C C C G A A G C T G A C C C A G G T A G T G C T G C C C C A T A C C T G A A G A C C A A G T T C A T C

6 9 4 H P E A D P G S A A P Y L K T K F I

2 1 6 2 T G T G T G A C A C C A A C G A C C T G C A G C A A T A C C A T T G A C C T G C C G A T G T C C C C C C G C

7 1 2 C V T P T T C S N T I D L P M S P R

***PKC(727-729)***

2 2 1 6 A C T T T A G A T T C A T T G A T G C A G T T T G G A A A T A A T G G T G A A G C T G C T G A A C C C T C A

7 3 0 T L D S L M Q F G N N G E A A E P S

2 2 7 0 G C A G G A G G G C A G T T T G A G T C C C T C A C G T T C G A C A T G G A G C T G A C C T C G G A G T G C

7 4 8 A G G Q F E S L T F D M E L T S E C

***N-myristoylation site(750-754)***

2 3 2 4 G C T A C C T C C C C C A T G T G A G G A G C A A A G G A C G G A G G C T G C A G A G A G A T G A T G G A T

766 A T S P M \*

2 3 7 8 G C G C C A A C C C A T G T C C C A C C A G C C C T T A C A C A G C C C A A G C C C A G A T C A A C T C A G C T C C C A

2 4 3 8 G C T T T G C G G T T C C A G A T T T T T T T T T T T T C C A T C T C T C G C T T T A G C T A T C T C T G A G C A A T C

2 4 9 8 T G A G C A C T T T T T A A A A A T A G A G A A A T G A A T G A A T G T G G G T G A T A T C C T T T T A T C T A C A T G

2 5 5 8 C A A A T A A G A A T A C G C A C T C C T T G A C T G T G A T C A G G G G A T G T G G A A G G G G C G G T G A G A G G G

2 6 1 8 A G A A A G A G G A A A C A T C T T T T T T G T C C T C C T C C C C C G C C C C C G G C C C C C T T T C T C A G C A G C

2 6 7 8 T T G T T G T C G T T G T G A G T C A A G T G C C T C C T G G T G C C A G C T G C A T C C T T C T G C C T A T A T A A G

2 7 3 8 C T G A T G C C A C G G G C T G C C T G T C G C T G C A T C C T C C T G G C A C C A C A C T T T T T C C A A C C T T G C

2 7 9 8 T A A C G T C C A G A T A G A T G C T A G G A C T T T C A A A G C C C C T A G G T T T C T T T T T A A T C T T A A G T A

2 8 5 8 A T T T T T T T T T A A G G G C A A A A G A C A C T G A C T G T A T T G G C A T A G C T T C C T C T G T A T T T A A G A

2 9 1 8 A A G T T A A T T T C C T C C T T G G T G C T T C A G G T A T T C A G C T T T C T T C A G G C C G A T A A T T T A T A T

2 9 7 8 A A T C C C T G A C A T G A A T T T T A G A T C C A A C C C T T A A A A G A T A T C T T C T G A A G A T G C C T T T G G

3 0 3 8 T T T G A A A T A G G A A G G T T G A A G G A G A C C C T A A A T A T T T T A G A C T T T T T T T T T A A A T A A A G T

3 0 9 8 T T T T A T T T T C C C C T T T A G C A T G T T G G C C T G T T T G T A G G T A A G G C T G G G C A G A G G G G C A C T

3 1 5 8 T A C A A C C T G A T C T C T C T T T C T C C C T G G G C T T C T C C T G T T G C C A A G T G T G G G G G G G T G T C T

3 2 1 8 T A G A A G G G A C G G G A C A A T T C T T C C T T T T C C C A T T G A C C T G A G C C C C T C T A C T G G G T G G C T

3 2 7 8 C C T T C C A G T G T C T A A A G G T C C C T T A T C C T G T T T G C T T T A C A C A C C T G G T C T T G G G A C C T T

3 3 3 8 T T C G G A T A A G A G G G A G A C A C T T A C A G G A T G A A T G T G A G T C A G A C T A C A G A C C C C C A G G C A

3 3 9 8 A G G G T C T A G T T G A G C T C A G G G A A T A T G G T T C T T A T C C C A G T T T C T T G G A G A T T T C C T G C T

3 4 5 8 G C A C C T G T A A T C A C T T C T T C A G T C T G T C A A G C C A G G G G C A A A G G C T T A G T G A T A A G C T C G

3 5 1 8 G G G T C C G T C A G T T G T G T G A G G G A A T G T A C A C T C C C A C C T C C C C C A G C G C T G G T A A C T G T C

3 5 7 8 T C C T C C C G T A G G G G C C C C A C A A T T A G G C A G A G C A A C T G C A T G T A C T G T G C A T C T C A G A A C

3 6 3 8 A C A G G T A G C A C G T G G G A T G G T C T C T G A T A C A G G G C C T C T C A G A C C A G A A G C A C A G C T A G A

3 6 9 8 T T G G G T C G G C T A C A G C C A C C T T G T C T C A G T T G A C C A G A G T T T C T A G G G A T G C T A T G C G T T

3 7 5 8 A C A C C C A A A T T C G C C A A T T T T T G A A G G G G A T A A G A C C T G C T C T C C A A G A C A A A C A G G G G T

3 8 1 8 T G A C A G G T A A T G C A G A G A G A T T C T C C T C C A A C T C T C T A G A T G G A A A T A A G C T T A A C A T G A

3 8 7 8 G G G A C C T G G G G C A A G A A C C C T G G C T T T G C T G G G G C A G A A A T C G T A A A A T C C G T G G C C C T T

3 9 3 8 A G G T C G T G T G A G T A T C T G G T T T T A A C C T T G A T A T T A G C A A A A G C C C T G A G A G G A G C T G A G

3 9 9 8 A C C C T C C C T T A A A G A A C C C C A T C C T C C A G G A C C T G C C T G C A T T C T T T C T G C C A G C C C C C T

4 0 5 8 G T C C A G C C A A G G G A T T C C C A A G G A T G C C T A A C C T A C T C A C A G G G T G G T T T G T G A G A T G C T

4 1 1 8 T T C C T G G C C A C T G C A T T C A A A T T C C A A T G T A T A C T T A C T T A A T A G T G T A A A A A T T T A T A T

4 1 7 8 T A T T A T G T T G T G G G T T T T T T T T T T T T G T A T A T T G C T G T A T C T A C T T T A A C T T T C A G A A A T

4238 AAA AGTTATATAGCAACCCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图3.2.1.2 藏羚羊*stat3*基因的cDNA序列及其推导的氨基酸序列

Fig 3.2.1.2 Tibetan antelope *stat3* cDNA and deduced amino acid sequence

asterisk(\*) point to stop codon; Different underlines stand for different modification sites, and CK-2 means Casein kinase II phosphorylation site, PKC means Protein kinase C phosphorylation site

|  |  |
| --- | --- |
| *T.antelope* | MPNGIRLQQLDTRYLEQLHQLYSDSFPMSCGQFLAPWIESQDWAYAASKESHATLVFHNLLGEIDQQYSRFLQESNVLYQ 80 |
| *B.taurus* | MAQWNQLQQLDTRYLEQLHQLYSDSFPMELRQFLAPWIESQDWAYAASKESHATLVFHNLLGEIDQQYSRFLQESNVLYQ 80 |
| *H.sapiens* | MAQWNQLQQLDTRYLEQLHQLYSDSFPMELRQFLAPWIESQDWAYAASKESHATLVFHNLLGEIDQQYSRFLQESNVLYQ 80 |
| S.scrofa | MAQWNQLQQLDTRYLEQLHQLYSDSFPMELRQFLAPWIESQDWAYAASKESHATLVFHNLLGEIDQQYSRFLQESNVLYQ 80 |
| *M. musculus* | MAQWNQLQQLDTRYLEQLHQLYSDSFPMELRQFLAPWIESQDWAYAASKESHATLVFHNLLGEIDQQYSRFLQESNVLYQ 80 |
| *R.norvegicus* | MAQWNQLQQLDTRYLEQLHQLYSDSFPMELRQFLAPWIESQDWAYAASKESHATLVFHNLLGEIDQQYSRFLQESNVLYQ 80 |
|  | Amino-terminal domain |
| *T.antelope* | HNLRRIKQFLQSRYLEKPMEIARIVARCLWEESRLLQTAATAAQQGGQANHPTAAVVTEKQQMLEQHLQDVRKRVQDLEQ 160 |
| *B.taurus* | HNLRRIKQFLQSRYLEKPMEIARIVARCLWEESRLLQTAATAAQQGGQANHPTAAVVTEKQQMLEQHLQDVRKRVQDLEQ 160 |
| *H.sapiens* | HNLRRIKQFLQSRYLEKPMEIARIVARCLWEESRLLQTAATAAQQGGQANHPTAAVVTEKQQMLEQHLQDVRKRVQDLEQ 160 |
| S.scrofa | HNLRRIKQFLQSRYLEKPMEIARIVARCLWEESRLLQTAATAAQQGGQANHPTAAVVTEKQQMLEQHLQDVRKRVQDLEQ 160 |
| *M. musculus* | HNLRRIKQFLQSRYLEKPMEIARIVARCLWEESRLLQTAATAAQQGGQANHPTAAVVTEKQQMLEQHLQDVRKRVQDLEQ 160 |
| *R.norvegicus* | HNLRRIKQFLQSRYLEKPMEIARIVARCLWEESRLLQTAATAAQQGGQANHPTAAVVTEKQQMLEQHLQDVRKRVQDLEQ 160 |

|  |  |
| --- | --- |
|  | Amino-terminal domain coiled-coiled domain |
| *T.antelope* | KMKVVENLQDDFDFNYKTLKSQGDMQDLNGNNQSVTRQKMQQLEQMLTALDQMRRSIVSELAGLLSAMEYVQKTLTDEEL 240 |
| *B.taurus* | KMKVVENLQDDFDFNYKTLKSQGDMQDLNGNNQSVTRQKMQQLEQMLTALDQMRRSIVSELAGLLSAMEYVQKTLTDEEL 240 |
| *H.sapiens* | KMKVVENLQDDFDFNYKTLKSQGDMQDLNGNNQSVTRQKMQQLEQMLTALDQMRRSIVSELAGLLSAMEYVQKTLTDEEL 240 |
| S.scrofa | KMKVVENLQDDFDFNYKTLKSQGDMQDLNGNNQSVTRQKMQQLEQMLTALDQMRRSIVSELAGLLSAMEYVQKTLTDEEL 240 |
| *M. musculus* | KMKVVENLQDDFDFNYKTLKSQGDMQDLNGNNQSVTRQKMQQLEQMLTALDQMRRSIVSELAGLLSAMEYVQKTLTDEEL 240 |
| *R.norvegicus* | KMKVVENLQDDFDFNYKTLKSQGDMQDLNGNNQSVTRQKMQQLEQMLTALDQMRRSIVSELAGLLSAMEYVQKTLTDEEL 240 |
|  | Coiled-coiled domain |
| *T.antelope* | ADWKRRQQIACIGGPPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPMLEERIVELFRNLMKSA 320 |
| *B.taurus* | ADWKRRQQIACIGGPPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPMLEERIVELFRNLMKSA 320 |
| *H.sapiens* | ADWKRRQQIACIGGPPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPMLEERIVELFRNLMKSA 320 |
| S.scrofa | ADWKRRQQIACIGGPPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPMLEERIVELFRNLMKSA 320 |
| *M. musculus* | ADWKRRQQIACIGGPPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPMLEERIVELFRNLMKSA 320 |
| *R.norvegicus* | ADWKRRQQIACIGGPPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPMLEERIVDLFRNLMKSA 320 |
|  | Coiled-coiled domain |
| *T.antelope* | FVVERQPCMPMHPDRPLVIKTGVQFTTKVRLLVKFPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESN 400 |
| *B.taurus* | FVVERQPCMPMHPDRPLVIKTGVQFTTKVRLLVKFPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESN 400 |
| *H.sapiens* | FVVERQPCMPMHPDRPLVIKTGVQFTTKVRLLVKFPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESN 400 |
| S.scrofa | FVVERQPCMPMHPDRPLVIKTGVQFTTKVRLLVKFPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESN 400 |
| *M. musculus* | FVVERQPCMPMHPDRPLVIKTGVQFTTKVRLLVKFPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESN 400 |
| *R.norvegicus* | FVVERQPCMPMHPDRPLVIKTGVQFTTKVRLLVKFPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESN 400 |
|  | DNA-binding domain |
| *T.antelope* | NGSLSAEFKHLTLREQRCGNGGRANCDASLIVTEELHLITFETEVYHQGLKIDLETHSLPVVVISNICQMPNAWASILWY 480 |
| *B.taurus* | NGSLSAEFKHLTLREQRCGNGGRANCDASLIVTEELHLITFETEVYHQGLKIDLETHSLPVVVISNICQMPNAWASILWY 480 |
| *H.sapiens* | NGSLSAEFKHLTLREQRCGNGGRANCDASLIVTEELHLITFETEVYHQGLKIDLETHSLPVVVISNICQMPNAWASILWY 480 |
| S.scrofa | NGSLSAEFKHLTLREQRCGNGGRANCDASLIVTEELHLITFETEVYHQGLKIDLETHSLPVVVISNICQMPNAWASILWY 480 |
| *M. musculus* | NGSLSAEFKHLTLREQRCGNGGRANCDASLIVTEELHLITFETEVYHQGLKIDLETHSLPVVVISNICQMPNAWASILWY 480 |
| *R.norvegicus* | NGSLSAEFKHLTLREQRCGNGGRANCDASLIVTEELHLITFETEVYHQGLKIDLETHSLPVVVISNICQMPNAWASILWY 480 |
|  | DNA-binding domain |
| *T.antelope* | NMLTNNPRNVNFFTKPPIGTWDQVAEVLSWQFSSTTKRGLSIEQLTTLAEKLLGPGVNYSGCQITWAKFCKENMAGKGFS 560 |
| *B.taurus* | NMLTNNPKNVNFFTKPPIGTWDQVAEVLSWQFSSTTKRGLSIEQLTTLAEKLLGPGVNYSGCQITWAKFCKENMAGKGFS 560 |
| *H.sapiens* | NMLTNNPKNVNFFTKPPIGTWDQVAEVLSWQFSSTTKRGLSIEQLTTLAEKLLGPGVNYSGCQITWAKFCKENMAGKGFS 560 |
| S.scrofa | NMLTNNPKNVNFFTKPPIGTWDQVAEVLSWQFSSTTKRGLSIEQLSTLAEKLLGPGVNYSGCQITWAKFCKENMAGKGFS 560 |
| *M. musculus* | NMLTNNPKNVNFFTKPPIGTWDQVAEVLSWQFSSTTKRGLSIEQLTTLAEKLLGPGVNYSGCQITWAKFCKENMAGKGFS 560 |
| *R.norvegicus* | NMLTNNPKNVNFFTKPPIGTWDQVAEVLSWQFSSTTKRGLSIEQLTTLAEKLLGPGVNYSGCQITWAKFCKENMAGKGFS 560 |
|  | DNA-binding domain |
| *T.antelope* | FWVWLDNIIDLVKKYILALWNEGYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVTFTWVEKDISGKTQIQSVEPY 640 |
| *B.taurus* | FWVWLDNIIDLVKKYILALWNEGYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVTFTWVEKDISGKTQIQSVEPY 640 |
| *H.sapiens* | FWVWLDNIIDLVKKYILALWNEGYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVTFTWVEKDISGKTQIQSVEPY 640 |
| S.scrofa | FWVWLDNIIDLVKKYILALWNEGYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVTFTWVEKDISGKTQIQSVEPY 640 |
| *M. musculus* | FWVWLDNIIDLVKKYILALWNEGYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVTFTWVEKDISGKTQIQSVEPY 640 |
| *R.norvegicus* | FWVWLDNIIDLVKKYILALWNEGYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVTFTWVEKDISGKTQIQSVEPY 640 |
|  | DNA-binding domain Src-homology-2 domain |
| *T.antelope* | TKQQLNNMSFAEIIMGYKIMDATNILVSPLVYLYPDIPKEEAFGKYCRPESQEHPEADPGSAAPYLKTKFICVTPTTCSN 720 |
| *B.taurus* | TKQQLNNMSFAEIIMGYKIMDATNILVSPLVYLYPDIPKEDAFGKYCRPESQEHPEADPGSAAPYLKTKFICVTPTTCSN 720 |
| *H.sapiens* | TKQQLNNMSFAEIIMGYKIMDATNILVSPLVYLYPDIPKEEAFGKYCRPESQEHPEADPGSAAPYLKTKFICVTPTTCSN 720 |
| S.scrofa | TKQQLNNMSFAEIIMGYKIMDATNILVSPLVYLYPDIPKEEAFGKYCRPESQEHPEADPGSAAPYLKTKFICVTPTTCSN 720 |
| *M. musculus* | TKQQLNNMSFAEIIMGYKIMDATNILVSPLVYLYPDIPKEEAFGKYCRPESQEHPEADPGSAAPYLKTKFICVTPTTCSN 720 |
| *R.norvegicus* | TKQQLNNMSFAEIIMGYKIMDATNILVSPLVYLYPDIPKEEAFGKYCRPESQEHPEADPGSAAPYLKTKFICVTPTTCSN 720 |
|  | Src-homology-2 domain |
| *T.antelope* | TIDLPMSPRTLDSLMQFGNNGEAAEPSAGGQFESLTFDMELTSECATSPM\*770 |
| *B.taurus* | TIDLPMSPRTLDSLMQFGNNGEAAEPSAGGQFESLTFDMELTSECATSPM\*770 |
| *H.sapiens* | TIDLPMSPRTLDSLMQFGNNGEAGEPSAGGQFESLTFDMELTSECATSPM\*770 |
| S.scrofa | TIDLPMSPRTLDSLMQFGNNGEAGEPSAGGQFESLTFDMELNSECATSPM\*770 |
| *M. musculus* | TIDLPMSPRTLDSLMQFGNNGEAGEPSAGGQFESLTFDMDLTSECATSPM\*770 |
| *R.norvegicus* | TIDLPMSPRTLDSLMQFGNNGEAGEPSAGGQFESLTFDMDLTSECATSPM\*770 |

图3.2.1.3 藏羚羊与其它哺乳动物物种STAT3蛋白的氨基酸序列比较

Fig.3.2.1.3. Comparison of amino acid sequence in STAT3 between Tibetan antelope and other mammalians Asterisk(\*) point to stop codon; Variation sites are marked by green highlight; Protein domain are marked by black box.

表3.2.1.1 藏羚羊与若干物种*stat3*基因编码区及氨基酸序列相似性比较

Table 3.2.1.1 the coding region and amino acid Homology ofstat3 between Pantholops hodgsonii and other species

| 物种  Species | 编码区相似性  Similarity of coding region (%) | 氨基酸相似性  Similarity of amino acid) (%) | GenBank 号  GenBank accession No |
| --- | --- | --- | --- |
| Bos taurus | 98.06 | 98.70 | NM\_001012671.2 |
| Homo sapiens | 92.96 | 98.70 | NM\_139276.2 |
| Rattus norvegicus | 90.06 | 98.44 | NM\_012747.2 |
| Mus musculus | 89.93 | 98.57 | NM\_213659.2 |
| Sus scrofa | 93.91 | 98.44 | DQ470570.1 |

28

38

69

100

84

*Homo sapiens Sus scrofa Mus musculus*

*Rattus norvegicus Patholops hodgsonii Bos taurus*

*Gallus gallus*

*Xenopus laevis*

图3.2.1.4 各物种的STAT3氨基酸序列NJ系统进化树

Fig. 3.2.1.4 NJ phylogenetic tree analysis based on amino acid sequence of STAT3 from different species.

### 3.2.2 藏系绵羊和低海拔绵羊*stat3*基因的部分编码区片段的获得

以藏系绵羊、低海拔绵羊心肌组织总RNA为模板，经RT-PCR扩增分别得到藏系绵羊、低海拔绵羊*stat3*基因的826bp、625bp、689bp三部分编码区片段，所得扩增片段纯化、回收后，连接于pGEM-T Easy载体，经转化、酶切鉴定确定含有目的片段的阳性克隆送上海英骏有限公司进行序列测定。所得结果经人工校对，除去质粒载体序列，利用DNAstar软件拼接分别得到藏系绵羊、低海拔绵羊*stat3*基因1593bp的部分编码区片段（图3.2.2.1）。利用DNAMAN软件将藏系绵羊、低海拔绵羊所获得的部分编码区序列与已报道哺乳类的*stat3*基因进行相似性比较（表3.2.2.1）。结果表明，藏系绵羊、低海拔绵羊*stat3*与哺乳类*stat3*具有较高的相似性，为89%~99%左右，其中与藏羚羊、牛的*stat3*序列高度相似，达到97.68%以上。由此确定本实验所克隆的序列为藏系绵羊、低海拔绵羊*stat3*的部分编码区序列。所得序列已提交到GenBank，藏系绵羊*stat3*部分编码区序列登录号为JF267364(图3.2.2.2)，低海拔绵羊此序列登录号为JF267352（图

3.2.2.3)。



图3.2.2.1 藏系绵羊和低海拔绵羊*stat3*基因RT-PCR电泳图

Fig.3.2.2.1 RT-PCR Products of stat3 Partial CDS between Tibetan sheep and sheep separated on gel. (A) 826bp product from coding region of *stat3* gene; (B) 625bp product from coding region of *stat3* gene; (C) 689bp product from coding region of *stat3* gene.

|  |
| --- |
| >gi|343055729|gb|JF267364.1| Ovis ammon signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mRNA, partial cds |
| CGGAGAAGCA TTGTGAGTGA GCTGGCGGGG CTTTTGT CAGC AATGGAGTAT GTGCAGAAAA CTCTCACG G |
| ATGAAG AATT GGCAGA CTG G AAGAGG CGAC AACAGA TTGC TTGCA TTGGA GGCCC TCC CA ACATC TGCC T |
| AGATCGGCTAGAAAACTGGATAACCTCATT AGCAGAATCTCAGCTTCAGA CCCGCCAACA AATTAAGAAA |
| CTGGAGGAGCTGCAGCAGAAGGTTAGCTACAAAGGGGACCCCATTGTACAGCACCGGCCAATGCTGGAGG |
| AGAG AAT CGT GGAG CTG TT T AGAA ACT TAA TGAA AAG TGC CTT CGT GGT G GAAC GGC AG C CCT GCA TGC C |
| T A T G C A T C C T G A C C G G C C A T T A G T C A T C A A G A C C G G T G T C C A G T T C A C A A C T A A A G T C A G A T T G C T G G T T |
| AA A T T CC C T G AG C T AA A T T A T CA A C TT A A A A TT A AA G T GT G CA T T GA C A A AG A C T CC G G G GA T G T TG C AG |
| CGCTCAGAGGGTCCCGGAAATTTAACATTCTGGGCACAAACACGAAAGTGATGAACATGGAAGAGTCT AA |
| CAATGGCAGCCTCTCAGCGGAGTTCAA GCACTTGACCCTGAGAGAGCAGAGATGCGGTAATGGGGGCCGA |
| G C C A A T T G T G A T G C C T C C C T G A T T G T G A C C G A G G A G C T G C A C C T G A T C A C C T T T G A G A C T G A G G T G T A T C |
| A CC A AG G C C T C AA G AT C G AC C TG G AG A C GC A CT C A TT G C C AG T G GT G G TG AT C T C CA A C A T CT G T CA G AT |
| GCCC AACGCC TGGGCGT CCAT CCT ATGGTAC AACATGC TGACC AACAACC CCAGGAAC GTGAACTTT TTC |
| ACC AA AC CC C CGA TC GG AAC GTG GG AT CAA GTG GC CG AGG TGC TG AG CTG GCA GT TC TC C TCT AC CA CC A |
| AGCGCGGGCTGAGCATCGAG CAGTTGACGA CGCTGGCGGA GAAGCTCTT A GGACCTGGTG TGAACTATT C |
| AG G G TG T C AG A TC A C AT G G G C TA A A TT T T G C AA A GA A A AC A TG G C TG G C A AG G G CT T C T C C TT C T GG G TC |
| TGG CT GG ACA ACA TC AT TG A CC TGG TG AAA AAG TA CA TC C TGG CC CT TT G GAA CG AAG GG TAT AT AA TGG |
| GC TT CA T CA G CA AG GA GA GG GA AC GG GC CA TC TT GA G CA C TA AG CC C CC A GG CA CC T TC C TG TT GA GA TT |
| CAGTGAAAGCAGCAAAGAAGGAGGAGTCACCTTCACCTGGGTGGAGAAGGACATCAGCGGCAAGACCCAG |
| A TC C A GT C A G T GG A AC C T T A C AC C A AG C A G C AG C T GA A CA A CA T G TC A T T T GC T G AA A T C A TC A T GG G CT |
| A T A A G A T C A T G G A T G C C A C C A A T A T C C T G G T G T C T C C G C T G G T C T A T C T C T A C C C T G A C A T T C C A A A G G A |
| GGAGGCATTCGGAAAGTACTGTCGGCCGGAGAGCCAGGAGCATCCCGAAGCTGACCCAGGTAGTGCTG CC |
| CCATACCTGA AGA CCAAGTTCATCTGTG TGACA CCAACGACCTGCAG CAATA CCATTGACCTG CCGATGT |
| C C C C C C G C A C T T T A G A T T C A T T G A T G C A G T T T G G A A A T A A T G G T G A A G G A G C T G |

图3.2.2.2 藏系绵羊*stat3*基因部分编码区序列

Fig. 3.2.2.2 Partial coding sequence of Tibetan sheep*stat3* gene

|  |
| --- |
| >gi|343055726|gb|JF267352.1| Ovis aries signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mRNA, partial cds |
| C G G A G A A G C A T T G T G A G T G A G C T G G C G G G G C T T T T G T C A G C A A T G G A G T A T G T G C A G A A A A C T C T C A C G G |
| A T G A A G A A T T G C C A G A C T G G A A G A G G C G A C A A C A G A T T G C T T G C A T T G G A G G C C C T C C C A A C A T C T G C C T |
| A G A T C G G C T A G A A A A C T G G A T A A C C T C A T T A G C A G A A T C T C A G C T T C A G A C C C G C C A G C A A A T T A A G A A G |
| CTGGAG GA AC TGCAGCA G AA GGTTA GCT AC AAAG GGG ACC CCATTGTAC A GCACCGG CC A ATGCTGG A G G |
| A G A G A A T C G T G G A G C T G T T T A G A A A C T T A A T G A A A A G T G C C T T C G T G G T G G A G C G G C A G C C C T G C A T G C C |
| T A T G C A T C C T G A C C G G C C A T T A G T C A T C A A G A C C G G T G T C C A G T T C A C A A C T A A A G T C A G A T T G C T G G T T |
| AAATTCC C TG AGCTAAAT TA TCAACT TAA A ATTAAAGT GT GCATTGAC AA AGACTC CGGG GATGTT GCA G |
| C T C T C A G A G G G T C C C G G A A A T T T A A C A T T C T G G G C A C A A A C A C G A A A G T G A T G A A C A T G G A A G A G T C T A A |
| CAATGG CAGCCTCTCAG CAG AGTTCA AGCA CTTGACCCTG AGAG AGCA GAGA TGCGGTA ATGGG GGCCG A |
| G C C A A T T G T G A T G C C T C C C T G A T T G T G A C C G A G G A G C T G C A C C T G A T C A C C T T T G A G A C T G A G G T G T A T C |
| ACCAAGGCC T CAAGATC GAC CTGGAGACGC ACTCAT TGC C AGTGGTGGT G ATCTC CAAC A TCTGT CAGA T |
| GCC C A A C G C C T G G G C G T C C A T C C T A T G G T A C A A C A T G C T G A C C A A C A A C C C C A A G A A C G T G A A C T T T T T C |
| ACCAAACC CC CGATCGGA AC GTGGGATC AA GTGGCC GA GG TGCTGAGC T G GCAGTT CTCC TCTAC CACCA |
| A G C G C G G G C T G A G C A T C G A G C A G T T G A C G A C G C T G G C G G A G A A G C T C T T A G G A C C T G G T G T G A A C T A T T C |
| AGGGTGTC AG ATCACAT GGG CTAAAT TTT G CAAAGAAAA CATG G C T G G C A A G G G C T T C T C C T T C T G G G T C |
| TGGCTGG AC A ACATCA TTGA CCTGGTGA A A AAGTA CATC C TGGCCCTTTG GAACG AAG G GTATATA AT GG |
| GCTTC ATCAGCAAGGAGAG GGAACGGGCC ATCTT GAGCA CTAAGCC CCCAGGC ACCTT CCTGT TGAGAT T |
| CAGTG AAA GC AGCA AAG AAG GAG GGG TCAC CTTCACCTG G GTGG AGA AGG ACATCA GCGG CAAG ACCCAG |
| ATCCAGT CAG T GGAACCT TA CACCAAGC AG CAGCTGAAC A ACATGT CAT T TGCTGAAAT C ATCATGGGC T |
| ATAAGATC AT GGATGCC ACCAAT ATCC TGGTGT CTC CGCT GGTCT ATCT CTAC CCT GACATT CCAAAGGA |
| GGAGGCATTC GGAAAGTACTG TCGGC CGGAGAGCCA GGAGCATCC CGAAGCTGAC CCAGGTGC TGCCC C A |
| T A C C T G A A G A C C A A G T T C A T C T G T G T G A C A C C A A C G A C C T G C A G C A A T A C C A C T G A C C T G C C G A T G T C C C |
| CCCGCACTTTAGATTCATTGATGCAGTTTGGAAATAATGGTGAAGGTGCTG |

图3.2.2.3 低海拔绵羊*stat3*基因部分编码区序列

Fig. 3.2.2.3 Partial coding sequence of sheep*stat3* gene

表3.2.2.1 藏系绵羊、低海拔绵羊与若干物种*stat3*基因部分编码区相似性比较

Table 3.2.2.1 the partial coding region ofstat3 among Tibetan sheep, sheep and other species

| 物种  Species | 部分编码区相似性  Similarity of partial coding region(%) | Genbank 号  GenBank accession No |
| --- | --- | --- |
|  | Tibetan sheep sheep |  |
| Pantholops hodgsonii | 99.50 98.68 | JF267357 |
| Bos taurus | 98.12 97.68 | NM\_001012671.2 |
| Homo sapiens | 93.29 93.04 | NM\_139276.2 |
| Rattus norvegicus | 89.91 89.47 | NM\_012747.2 |
| Mus musculus | 90.53 90.15 | NM\_213659.2 |
| Sus scrofa | 94.10 93.79 | DQ470570.1 |

### 3.2.3 hif-1α基因的cDNA获得及序列分析

以藏羚羊肺组织总RNA为模板，经RT-PCR扩增得到1359 bp的*hif-1α*中间片段，经3’RACE PCR和5’RACE PCR分别得到1685 bp和681 bp的hif-1α两端（图3.2.3.1），将获得的三段序列经DNAstar拼接后，去除重叠序列得到3664 bp hif-1α基因的cDNA序列，该序列包含2471 bp的开放阅读框和1191 bp的3’UTR区。其3’UTR区具有脊椎动物典型的加尾信号AATAAA和29 bp的Poly A尾巴。

此序列已提交到GenBank, 获得登录号为JF267358. 藏羚羊*hif-1α*cDNA的开放阅读框编码823个氨基酸。预测蛋白质分子量约为92kDa, pI为5.02，包含核定位信号(nuclear localization signal, NLS)、碱性-螺旋-环-螺旋/PAS 结构域

（bHLH/PAS）、氧依赖降解结构域(oxygen-dependent degradation domain, ODDD)、

TAD等保守氨基酸序列。拓扑结构预测显示该蛋白上有44个潜在的功能位点：

3个N-糖基化位点(49NVSS, 206NQSQ, 585NSST)，1个cAMP和cGMP依赖性

蛋白激酶磷酸化位点(11KKiS)，6个N-肉豆蔻酰化位点（2GGagGA，3GAggAN，

298GQvtTG，414GSndAE，660GSrtAS，754GCksSE)，11个蛋白激酶C磷酸化位点(15SeR，28SrR，149ThR，163TqR, 176TsR，188TwK，458TpK，505StR，

677TeK, 693SqR, 748SwK)，2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(32KesEvfY ，

258RitElmgY)，21 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点(52ShlD，123TqfE，131SvfD，

231SniE, 253SycD, 274SiyE, 290ThhD, 376TkvE, 385SlfD, 438SsnE, 464SsaD，

500SpsD, 509SspE, 515SpsE, 551StqD, 555TdlD, 581SplE, 617TndE, 697TapE，

783SmdE，793TsyD）这与GenBank中已报道的其它哺乳动物的*hif-1α*在二级结构和潜在功能位点上相一致（图3.2.3.2）。



利用DNAMAN软件将藏羚羊hif-1α基因的编码区序列和氨基酸序列与已报道哺乳类的hif-1α进行相似性比较（图3.2.3.3, 表3.2.3.1）。结果表明，藏羚羊*hif-1α*与哺乳类hif-1α具有较高的相似性，为87%~99%左右，其中与牛的hif-1α序列高度相似，达到98.95%以上。根据HIF-1α的氨基酸序列，利用Mega 4.1软件的NJ方法构建哺乳类HIF-1α的分子进化树(图3.2.3.4)，HIF-1α进化树与传统的物种系统进化关系基本一致，藏羚羊与牛归为一支。上述结果表明本实验所克隆的序列为藏羚羊hif-1α的cDNA序列。

图3.2.3.1 藏羚羊*hif-1α*基因RT-PCR及RACE PCR电泳图

Fig. 3.2.3.1 Products of RT-PCR and RACE PCR of *hif-1α*cDNA from Tibetan antelope separated on gel. A: 1359bp product from coding region of the cDNA. B: 1685bp product from 3′end of cDNA and 681bp product from 5′end of cDNA

1 AC

3 A T G GGG GGC GCC G G G G G C G C G AAC GAC A A G AAA AAG A T A A G T T C T G A A C G T C G A

1 M G G A G G A N D K K K I S S E R R

***N-myristoylation site(2-7)*** N-myristoylation ***site(3-8)*** cAMP&cGMP's dependent protein kinase  ***PKC(15-17)***

***Phosphorylation sites (52-55)***

5 7 A A A GAG A A A T C T A G A G A T G C A G C C A G A TCT CGT CGA A G T A A A G A G T C T G A A GTT

1 9 K E K S R D A A R S R R S K E S E V

***PKC(28-30)*** tyrosine kinase phosphorylation ***sites(32-38)***

1 1 1 TTT T A T GAG C T T GCT CAT C A G TTG CCA C T C C C C CAT A A T G T A A G C T C G CAT C T T

37 F Y E L A H Q L P L P H N V S S H L

***N-glycosylation site(49-52) Ck-2*** ***(52-57)***

1 6 5 GAT AAG G C T T C T G T T A T G AGG C T C A C C AT C AGC T A T T T G C G T G T G AGG A A A CTT

5 5 D K A S V M R L T I S Y L R V R K L

2 1 9 C T G GAT GCT G G T G A T TTG G A T A T T G A A GAT G A A A T G AAG G C A C A G A T G AAT T G C

7 3 L D A G D L D I E D E M K A Q M N C

2 7 3 TTT T A T T T G A A A G C C T T G G A T GGT TTT GTC A T G G T T C T C ACA G A T G A T G G T G A C

9 1 F Y L K A L D G F V M V L T D D G D

3 2 7 A T G A T T T A C A T T T C C G A C A A T G T G A A C AAA TAC A T G GGA TTA ACT C A G TTT GA A

1 0 9 M I Y I S D N V N K Y M G L T Q F E

***Ck-2(123-125)***

3 8 1 C T A A C T GGA CAC A G T G T G TTT GAT TTT A C T C A T CCT T G T GAC CAT GAG GAA A T G

1 2 7 L T G H S V F D F T H P C D H E E M

***Ck-2(131-134)***

4 3 5 A G A G A A A T G C T T ACA C A C AGA AAT GGC C T T G T A A A A A A G G G T A A A G A G CAA AAT

1 4 5 R E M L T H R N G L V K K G K E Q N

***PKC(149-151)***

4 8 9 ACA CAG CGG A G C T T T TTT C T C AGA A T G A A G T G T ACC C T A A C T A G C CGG GGG AGA

1 6 3 T Q R S F F L R M K C T L T S R G R

***PKC(163-165)*** PKC(176 ***-178)***

5 4 3 A C T A T G AAC A T A A A A T C T G C A ACA T G G A A A G T A C T T C A C T G C ACA G G C C A T A T T

1 8 1 T M N I K S A T W K V L H C T G H I

***PKC(188-190)***

5 9 7 C A T G T A T A T G A T A C C AAC A G T A A C C A A T C T CAG T G T G G G T A T A A G AAA CCA C C G

1 9 9 H V Y D T N S N Q S Q C G Y K K P P

***N-glycosylation site(206-209)***

6 5 1 A T G ACA T G C TTG G T G C T G A T T T G T GAA C C C A T T CCT CAT CCA T C A AAC A T T G A A

2 1 7 M T C L V L I C E P I P H P S N I E

***Ck-2(231-234)***

7 0 5 A T T C C T T T A GAC A G C A A G A C T TTT C T C AGT CG T C A C A G T C T G G A T A T G AAA TTT

2 3 5 I P L D S K T F L S R H S L D M K F

7 5 9 T C T T A T T G T G A T G A A A G A A T T ACA G A A T T G A T G GGA T A T G A G C C A GAA GAA C T T

2 5 3 S Y C D E R I T E L M G Y E P E E L

***Ck-2(253-256)*** ttyrosine kinase phosphorylation ***sites(258-265)***

8 1 3 TTG GGC CGC T C A A T T T A T G A A T A T T A T CAT GCC TTG G A C T C T GAC C A T C T G ACC

2 7 1 L G R S I Y E Y Y H A L D S D H L T

***Ck-2(274-277)***

8 6 7 AAA A C T C A T C A T GAT A T G TTT A C T A A A GGA CAA G T C ACA ACA GGA CAG T A C AGA

2 8 9 K T H H D M F T K G Q V T T G Q Y R

***Ck-2(290-293)*** N-myristoylation ***site(298-233)***

9 2 1 A T G CTT GCC AAA A G A G G T GGA T A T G T C T G G A T T GAA ACT CAA GCA A C T G T C A T A

3 0 7 M L A K R G G Y V W I E T Q A T V I

9 7 5 T A T A A C A C T A A G A A C T C T C A G CCC C A G TGC A T T G T A T G T G T A AAT T A T G T T G T G

3 2 5 Y N T K N S Q P Q C I V C V N Y V V

1 0 2 9 A G T GGT A T T A T T C A G CAC G A C TTG A T T TTC T C C C T T CAA C A A A C A GAA T G T G T C

3 4 3 S G I I Q H D L I F S L Q Q T E C V

1 0 8 3 C T C AAA C C A G T T GAA T C T T C A GA C A T G A A A A T G A C T CAG C T A TTC A C C A A A G T T

3 6 1 L K P V E S S D M K M T Q L F T K V

***Ck-2(376-378)***

1137 G A A T C A GAA G A T A C A AGC A G T C T C T T T GAT AAA C T T A A G AAG GAG C C T GAT G C T

3 7 9 E S E D T S S L F D K L K K E P D A

***Ck-2(385-388)***

1191 TTA A C T T T G C T G GCA CCA GCT GCT GGA G A C A C A A T C A T A T C T T T A GAT TTT GGC

3 9 7 L T L L A P A A G D T I I S L D F G

1 2 4 5 A G C A A T G A C G C A G A G A C T GAT G A C C A A C AA C T T G A G G A A G T T CCA TTG T A T A A T

4 1 5 S N D A E T D D Q Q L E E V P L Y N

***N-myristoylation site(414-419)***

1 2 9 9 GAT G T A A T G C T C C C C T C A T C T AAT GAG A A A TTG CAG A A T A T A A A T TTG GCA A T G

4 3 3 D V M L P S S N E K L Q N I N L A M

***Ck-2(438-440)***

1 3 5 3 T C T CCA TTA C C T G C C T C T G A A ACT C C A AAG C C A C T T A G A A G T AGT G C C G A C CCT

4 5 1 S P L P A S E T P K P L R S S A D P

***PKC(458-460)*** ***Ck-2(464-467)***

1 4 0 7 G C A C T C A A C C A A G A A G T T GCG T T A A A G TTA G A A CCA AAT CCA G A G T C A C T G G A A

4 6 9 A L N Q E V A L K L E P N P E S L E

1461 C T T T C T TTC A C C A T G CCC C A G A T T CAA G A T C A G CCA GCT A G T C C T T C T G A T G G A

4 8 7 L S F T M P Q I Q D Q P A S P S D G

***Ck-2(500-503)***

1515 AGC A C C A G A CAA A G T T C A CCT GAG C C T AAC A G T C C C A G T GAA T A T T G T TTT GAT

5 0 5 S T R Q S S P E P N S P S E Y C F D

***PKC(505-507)*** Ck-2(509-512) Ck-2(515-518)

1569 G T G G A T AGT G A T A T G G T C AAT GAA TTC AAG TTG GAA T T G G T A G A G AAA C T T TTT

5 2 3 V D S D M V N E F K L E L V E K L F

1623 GCT GAA G A T ACA G A A G C A A A G A A T C C A TTT T C C A C T C A G GAC A C T G A T T T A G A C

5 4 1 A E D T E A K N P F S T Q D T D L D

***Ck-2(551-554)*** Ck-2(555-558)

1677 TTG GAG A T G T T A GCT CCT T A T A T C C C A A T G GAT GAT GAC TTC CA G TTA C G T TCC

5 5 9 L E M L A P Y I P M D D D F Q L R S

1731 TTT G A T CAG TTG TCA CCA C T G GAA AAC A G T T C T A C A A G T C C T C A A AGT GCA AGC

5 7 7 F D Q L S P L E N S S T S P Q S A S

***Ck-2(581-584)*** N-glycosylation ***site(585-588)***

G T A T T C CAG CCC ACT CAA A T G CAA G A A C C T CCT A T A G C C A C C GCC V F Q P T Q M Q E P P I A T A

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 7 8 5 | A C A | G A T A C A |
| 5 9 5 | T | D T |
| 1 8 3 9 | A C T | ACC A C A |

G C C A C C A A T G A T G A A TTG A A A A C A G T G ACA A A A G A T G G T A T G G A A 6 1 3 T T T A T N D E L K T V T K D G M E

***Ck-2(617-620)***

1 8 9 3 G A C A T T AAA A T A CTG A T T G C A T T T CCA T C T CCT C C C C A C G T A C C T A A A G A A C C T

6 3 1 D I K I L I A F P S P P H V P K E P

1947 CCT T G T GCC ACA A C G T C A CCA T A T A G T G A T ACT GGA A G T CGG ACA G C C T C A CCC

6 4 9 P C A T T S P Y S D T G S R T A S P

***N-myristoylation site(660-665)***

2001 AAC A G A GCA GGA A A A GGA GT C A T A GAA C A G A C A GAA A A G T C T C A T C C A AGA A G C

6 6 7 N R A G K G V I E Q T E K S H P R S

***PKC(677-679)***

2 0 5 5 C C T A A T G T G TTA TCT G C C G C T TTG AGT C A A A G A A C T A C T GCT CCT G A G G A A G A A

6 8 5 P N V L S A A L S Q R T T A P E E E

***PKC(693-695)*** Ck-2(697-670)

2109 C T A A A T CCA A A G A T A C T A G C T T T G CAG A A T GCT CAG A G A A A G C G A AAA A T T G A A

7 0 3 L N P K I L A L Q N A Q R K R K I E

2163 C A T G A T GGT T C A CTT T T T C A A GCA G T A G G A A T T GGA A C A TTA T T A C A G C A A C C A

7 2 1 H D G S L F Q A V G I G T L L Q Q P

2217 GAT GAT C G T GCA ACT A C C ACA T C A C T T T C T T G G AAA C G T G T A AAA GGA T G C AAA

7 3 9 D D R A T T T S L S W K R V K G C K

***PKC(748-750)*** N-myristoylation ***site(754-759)***

2 2 7 1 T C T AGT GAA C A G A A T GGA A T G GAG CAA A A G A C A A T T A T T T T A A T A CCC T C T GAT

7 5 7 S S E Q N G M E Q K T I I L I P S D

2325 TTA G C A T G T AGA C T G C T G GGG CAA TCA A T G G A T G A G A G T GGA C T A CCA CAG C T G

7 7 5 L A C R L L G Q S M D E S G L P Q L

***Ck-2(783-786)***

2379 ACC A G T T A T G A T T G T GAA G T T AAT G C T C C T A T A CAA G G C A G C A G A AAC C T A C T G

7 9 3 T S Y D C E V N A P I Q G S R N L L

***Ck-2(793-796)***

2 4 3 3 C A G G G T GAA G A A T T A C T C A G A GCT TTG GAT CAA G T T A A C T G A G C T T T T T C A T A A

811 Q G E E L L R A L D Q V N \*

2 4 8 7 T C T C A T T C C T T T T T T T G G A C A C T G G T G G C T C A T T A C C T A A A G C A G T C T A T T T A T A T T T T C

2 5 4 7 T A T A T C T A A T T T T A G A A G C C T G G C T A C A A A T A C T G C A C A A A C T C G G T T A G T T C A A T T T T G

2 6 0 7 A T C C C C T T T C T A C T T A A G T T A C A T T A A T G C T C T T T T T T A G T A T G T T C T T T A A C G C C A G A T

2 6 6 7 C A C A C A C A G C A C A T T T T C A T A G T T C T T C G G T A T T T A A A C C A T T G C A T T G C A G T A G C A T C A

2 7 2 7 T T T T T A A A A T G C A C C T T T T T A T T T A T T T A T T T T G G G C T A G G G A G T T T G T C C C T T A T C G A A

2 7 8 7 T T A T T T T T A A T A A G A T G C C A A T A T A A T T T T T T T A A G A A G G C T G T A A C C T T T C A T C A T G A G

2 8 4 7 T T T A A A A A A T T T T T A C T C A G T T T T T T C A C A T T T T A C A T A A A C A A T A A T G A T T T G C C A G C A

2 9 0 7 G T A C A T G G T A G C C G C A A T T G C A C A A T A T A T T T T C T T A A A A A A A T A C C A G C A G T T A C T C A T

2 9 6 7 G C A A T A T A T T C T G C A T T T A T A A A A C T A G T T T T T A A G A A A A A A T T T T T T T T G G C C T A T G A A

3 0 2 7 A T T A T T A A A C C T G G A A C A T G A C A T T G T T A A T C A T A T A A T A A T G A T T C T T A A A T G C T T G T A

3 0 8 7 T G A T T T A T T A T T T A A A T G G G T A A A G C C A T T T A C A T G A T A T A G A A A G A T A T A C A T A T A T C T

3 1 4 7 G G A A G G T A T G T G G C A T T T A T T T G G A T A A A A T T C T C A A T T C A G A G A A A T G A T T T G A T G T T T

3 2 0 7 C T G T A G T C A C T T T G C C A G C T C A A A A A A C A A T A C C C T A T C T G T A G T T G T G G A A G T T T A T G C

3 2 6 7 T A A T A T T G T G T A A T T G A T A T T A A A C C T A A A T G T T C T G C C C A C C C T G T T G G T A T A A A G G T A

3 3 2 7 T T T T G A G C A G A T T G T G A A C A A A A A A A T C A T G C T T T G T T A G C A A A A T T G C C T A G T A A T G T T

3 3 8 7 A A T T T G C T C A A A A T C T G A T G T T T G G T T T T A T G C A C T T T G T C G C T A T T A A C A T C C T T C T G T

3 4 4 7 T T T C A T A T A G A T T T C A A T A A T T G A G T A C T T T T A G A A G C A T T A T T T T A G A A A T A T A C A G T T

3 5 0 7 G T C A C A G T A A A C A T C T T G T T T T T C T A T G T G C A T T G T A C A A A T T T T T C A T T C C T T T T G C T C

3 5 6 7 T T T G T G G T T G G A T C T T C T A A C A C T A A C T G T A T G G T T T T G T T A C A T C A A A T A A A C A T C T T T

3627 TGCGGACCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图3.2.3.2 藏羚羊*hif-1α*基因的cDNA序列及其推导的氨基酸序列

Fig 3.2.3.2 Tibetan antelope *hif-1α*cDNA and deduced amino acid sequence

asterisk(\*) point to stop codon; Different underlines stand for different modification sites, and CK-2 means Casein kinase II phosphorylation site, PKC means Protein kinase C phosphorylation site

|  |  |
| --- | --- |
| *T.antelope* | MGGAGGANDKKKISSERRKEKSRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGDLDI 80 |
| *B.taurus* | MEGAGGANDKKKISSERRKEKSRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGDLDI 80 |
| *B.grunniens* | MEGAGGANDKKKISSERRKEKSRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGDLDI 80 |
|  | HLH binding Domain |
|  |  |
| *T.antelope* | EDEMKAQMNCFYLKALDGFVMVLTDDGDMIYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVFDFTHPCDHEEMREMLTHRNGLVKKGKE 160 |
| *B.taurus* | EDEMKAQMNCFYLKALDGFVMVLTDDGDMIYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVFDFTHPCDHEEMREMLTHRNGLVKKGKE 160 |
| *B.grunniens* | EDEMKAQMNCFYLKALDGFVMVLTDDGDMIYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVFDFTHPCDHEEMREMLTHRNGLVKKGKE 160 |
|  |  |
|  | HLH binding Domain PAS domain |
| *T.antelope* | QNTQRSFFLRMKCTLTSRGRTMNIKSATWKVLHCTGHIHVYDTNSNQSQCGYKKPPMTCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSK 240 |
| *B.taurus* | QNTQRSFFLRMKCTLTSRGRTMNIKSATWKVLHCTGHIHVYDTNSNQSQCGYKKPPMTCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSK 240 |
| *B.grunniens* | QNTQRSFFLRMKCTLTSRGRTMNIKSATWKVLHCTGHIHVYDTNSNQSQCGYKKPPMTCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSK 240 |

|  |  |
| --- | --- |
| *T.antelope* | ATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLL 320 |
| *B.taurus* | ATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLL 320 |
| *B.grunniens* | ATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLL 320 |
|  | PAS domain PAS domain |
| *T.antelope* | ATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLL 400 |
| *B.taurus* | ATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLL 400 |
| *B.grunniens* | ATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLL 400 |
|  | PAS domain |
| *T.antelope* | APAAGDTIISLDFGSNDAETDDQQLEEVPLYNDVMLPSSNEKLQNINLAMSPLPASETPKPLRSSADPALNQEVALKLEP 480 |
| *B.taurus* | APAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLEEVPLYNDVMLPSSNEKLQNINLAMSPLPASETPKPLRSSADPALNQEVALKLEP 480 |
| *B.grunniens* | APAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLEEVPLYNDVMLPSSNEKLQNINLAMSPLPASETPKPLRSSADPALNQEVALKLEP 480 |
|  | Oxygen-dependent degradation domain |
|  |  |
| *T.antelope* | NPESLELSFTMPQIQDQPASPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFDVDSDMVNEFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLDLE 560 |
| *B.taurus* | NPESLELSFTMPQIQDQPASPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFDVDSDMVNEFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLDLE 560 |
| *B.grunniens* | NPESLELSFTMPQIQDQPASPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFDVDSDMVNEFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLDLE 560 |
|  | Oxygen-dependent degradation domain N terminal transactivation domain |
|  |  |
| *T.antelope* | MLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLENSSTSPQSASTDTVFQPTQMQEPPIATATTTATNDELKTVTKDGMEDIKILIAFPS 640 |
| *B.taurus* | MLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLENSSTSPQSASTNTVFQPTQMQEPPIVTATTTATSDELKTVTKDGMEDIKILIAFPS 640 |
| *B.grunniens* | MLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLENSSTSPQSASTNTVFQPTQMQEPPIVTATTTATSDELKTVTKDGMEDIKILIAFPS 640 |
|  | Oxygen-dependent degradation domain |
| *T.antelope* | PPHVPKEPPCATTSPYSDTGSRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRSPNVLSAALSQRTTAPEEELNPKILALQNAQRKRKIE 720 |
| *B.taurus* | PPHVPKEPPCATTSPYSDTGSRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRSPNVLSVALSQRTTAPEEELNPKILALQNAQRKRKIE 720 |
| *B.grunniens* | PPHVPKEPPCATTSPYSDTGSRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRSPNVLSVALSQRTTAPEEELNPKILALQNAQRKRKIE 720 |
|  | Nuclear localization signal |
| *T.antelope* | HDGSLFQAVGIGTLLQQPDDRATTTSLSWKRVKGCKSSEQNGMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSYDCEVN 800 |
| *B.taurus* | HDGSLFQAVGIGTLLQQPDDRATTTSLSWKRVKGCKSSEQNGMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSYDCEVN 800 |
| *B.grunniens* | HDGSLFQAVGIGTLLQQPDDRATTTSLSWKRVKGCKSSEQNGMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSYDCEVN 800 |
|  | C terminal transactivation domain |
| *T.antelope* | APIQGSRNLL QGEELLRALD QVN\* 823 |
| *B.taurus* | APIQGSRNLL QGEELLRALD QVN\* 823 |
| *B.grunniens* | APIQGSRNLL QGEELLRALD QVN\* 823 |

图3.2.3.3 藏羚羊与原牛、野牦牛HIF-1α蛋白的氨基酸序列比较

Fig.3.2.3.3 Comparison of amino acid sequence in HIF-1αamong Tibetan antelope, *Bos Taurus and Bos grunniens* Asterisk(\*) point to stop codon; Variation sites are marked by green highlight; Protein domain are marked by black box.

表3.2.3.1 藏羚羊与若干物种*hif-1α*基因编码区及氨基酸序列相似性比较

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 物种  Species | 编码区相似性  Similarity of coding region (%) | 氨基酸相似性  Similarity of amino acid) (%) | GenBank 号  GenBank accession No |
| *Bos taurus* | 98.95 | 99.27 | NM\_174339.3 |
| *Bos grunniens* | 98.87 | 99.27 | AY621118.1 |
| *Homo sapiens* | 93.55 | 94.92 | NM\_001530.3 |
| *Pongo abelii* | 93.48 | 94.68 | NM\_001133503.1 |
| *Macaca fascicularis* | 93.71 | 94.79 | AB169332.1 |
| *Spermophilus tridecemlineatus* | 92.60 | 94.53 | AY713478.1 |
| *Eospalax cansus* | 89.62 | 92.11 | EF584452.1 |
| *Eospalax baileyi* | 89.67 | 91.39 | DQ229099.1 |
| *Spalax judaei* | 90.34 | 91.99 | AJ715791.1 |
| *Microtus kikuchii* | 88.27 | 91.19 | HM125970.1 |
| *Microtus oeconomus* | 88.11 | 90.95 | DQ010149.1 |
| *Rattus norvegicus* | 87.69 | 89.94 | NM\_024359.1 |
| *Mus musculus* | 87.13 | 88.42 | NM\_010431.2 |

Table 3.2.3.1 The coding region and amino acid homology of*hif-1α*between *Pantholops hodgsonii* and other species

33

99

54

75

99

92

100

91

91

*Bos taurus Bos grunniens*

*Patholops hodgsonii*

*Macaca fascicularis Homo sapiens Pongo abelii*

*Spermophilus tridecemlineatus*

*Eospalax baileyi Eospalax cansus*

100 87 98

96

99

*Spalax judaei Rattus norvegicus*

*Mus musculus Microtus kikuchii*

*Microtus oeconomus Xenopus laevis*

*Danio rerio Gymnocypris przewalskii*

图3.2.3.4 各物种的HIF-1α氨基酸序列NJ系统进化树

Fig. 3.2.3.4 NJ phylogenetic tree analysis based on amino acid sequence of HIF-1αfrom different species.

### 3.2.4 藏系绵羊和低海拔绵羊hif-1α基因部分编码区序列的获得

以藏系绵羊、低海拔绵羊肺组织总RNA为模板，经RT-PCR扩增分别得到藏系绵羊、低海拔绵羊hif-1α1359bp的部分编码区片段，所得扩增片段纯化、回收后，克隆于pGEM-T Easy载体，经转化、酶切鉴定确定含有目的片段的阳性克隆，选取其中2个阳性克隆送上海英骏有限公司进行序列测定（图3.2.4.1）。所得结果经人工校对，除去质粒载体序列，并利用DNAMAN软件将藏系绵羊、低海拔绵羊该部分编码区序列与已报道哺乳类的hif-1α进行相似性比较（表

3.2.4.1）. 结果表明，藏系绵羊、低海拔绵羊*hif-1α*与哺乳类*hif-1α*具有较高的相似性，为84%~99%左右，其中与藏羚羊、牛的*hif-1α*序列高度相似，达到98.53%以上。由此确定所克隆的序列分别为藏系绵羊、低海拔绵羊*hif-1α*的部分编码区序列。上述序列已提交到GenBank，藏系绵羊、低海拔绵羊*hif-1α*部分编码区序列登录号分别为JF267365、JF267353（图3.2.4.2, 图3.2.4.3）。



图3.2.4.1 藏系绵羊和低海拔绵羊*hif-1α*基因部分编码区片段的RT-PCR电泳图

Fig. 3.2.4.1 RT-PCR Products of*hif-1α*Partial CDS between Tibetan sheep and sheep

|  |
| --- |
| >gi|343055500|gb|JF267365.1| Ovis ammon hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit (HIF1A) mRNA, partial cds |
| T G C T T G G T G C T G A T T T G T G A A C C C A T T C C T C A T C C A T C A A A T A T T G A A A T T C C T T T A G A C A G C A A G A C T T |
| T T C T C A G T C G T C A C A G T C T G G A T A T G A A A T T T T C T T A T T G T G A T G A A A G A A T T A C A G A A T T G A T G G G A T A |
| T G A G C C A G A A G A A C T T T T G G G C C G C T C A A T T T A T G A A T A T T A T C A T G C C T T G G A C T C T G A C C A T C T G A C C |
| A A A A C T C A T C A T G A T A T G T T T A C T A A A G G A C A A G T C A C A A C A G G A C A G T A C A G A A T G C T T G C C A A A A G A G |
| G T G G A T A T G T C T G G A T T G A A A C T C A A G C A A C T G T C A T A T A T A A C A C T A A G A A C T C T C A G C C C C A G T G C A T |
| T G T A T G T G T A A A T T A C G T T G T G A G T G G T A T T A T T C A G C A C G A C T T G A T T C T C T C C C T T C A A C A A A C A G A A |
| T G T A T C C T C A A A C C A G T T G A A T C T T C A G A C A T G A A A A T G A C T C A G C T A T T C A C C A A A G T T G A A T C A G A A G |
| A T A C A A G C A G T C T C T T T G A T A A A C T T A A G A A G G A G C C T G A T G C T T T A A C T T T G C T G G C A C C A G C T G C T G G |
| A G A C A C A A T C A T A T C T T T A G A T T T T G G C A G C A A T G A C A C A G A G A C T G A T G A C C A A C A A C T T G A G G A A G T T |
| C C A T T G T A T A A T G A T G T A A T G C T C C C C T C A T C T A A T G A G A A A C T G C A G A A T A T A A A T T T G G C A A T G T C T C |
| C A T T A C C T G C C T C T G A A A C T C C A A A G C C A C T T A G A A G T A G T G C C G A C C C T G C A C T C A A C C A A G A A G T T G C |
| A T T A A A G T T A G A A C C A A A T C C A G A G T C A C T G G A A C T T T C T T T C A C C A T G C C C C A G A T T C A A G A T C A G C C A |
| G C T A G T C C T T C G G A T G G A A G C A C C A G A C A A A G T T C A C C T G A G C C T A A C A G T C C C A G T G A A T A T T G T T T T G |
| A T G T G G A T A G T G A T A T G G T C A A T G A A T T C A A G T T G G A A T T G G T A G A G A A A C T T T T T G C T G A A G A T A C A G A |
| A G C A A A G A A T C C A T T T T C C A C T C A G G A C A C T G A T T T A G A C T T G G A G A T G T T A G C T C C T T A T A T C C C A A T G |
| G A T G A T G A C T T C C A G T T A C G T T C C T T T G A T C A G T T G T C A C C A C T G G A A A A C A G T T C T A C A A G T C C T C A A A |
| G T G C A A G C A C A A A T A C A G T A T T C C A G C C C A C T C A A A T G C A A G A A C C T C C T A T A G C C A C C G C C A C T A C C A C |
| C G C C A C C A A T G A T G A A T T G A A A A C A G T G A C A A A A G A T G G T A C G G A A G A C A T T A A A A T A C T G A T T G C A T T T |
| C C A T C T C C T C C C C A C G T A C C T A A A G A A C C T C C T T G T G C C A C A A C G T C A C C A T A T A G T G A T A C T G G A A G T C |
| GGACAGCCTCACCCAACAGAGCAGGAAA |

图3.2.4.2 藏系绵羊*hif-1α*基因部分编码区序列

Fig. 3.2.4.2 Partial of Tibetan sheep*hif-1α*gene coding sequence

|  |
| --- |
| >gi|343055699|gb|JF267353.1| Ovis aries hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit (HIF1A) mRNA, partial cds |
| T G C T T G G T G C T G A T T T G T G A A C C C A T T C C T C A T C C A T C A A A T A T T G A A A T T C C T T T A G A C A G C A A G A C T T |
| T T C T C A G T C G T C A C A G T C T G G A T A T G A A A T T T T C T T A T T G T G A T G A A A G A A T T A C A G A A T T G A T G G G A T A |
| T G A G C C A G A A G A A C T T T T G G G C C G C T C A A T T T A T G A A T A T T A T C A T G C C T T G G A C T C T G A C C A T C T G A C C |
| AAAACCCAT C AT GA T A T G TTT AC T AAAGGA CAAGT CACAA CAGGACAGT A CAGAAT GC TTGCCAAAAGAG |
| G T G G A T A T G T C T G G A T T G A A A C T C A A G C A A C T G T C A T A T A T A A C A C T A A G A A C T C T C A G C C C C A G T G C A T |
| T G T A T G T G T A A A T T A C G T T G T G A G T G G T A T T A T T C A G C A C G A C T T G A T T T T C T C C C T T C A A C A A A C A G A A |
| T G T G T C C T C A A A C C A G T T G A A T C T T C A G A C A T G A A A A T G A C T C A G C T A T T C A C C A A A G T T G A A T C A G A A G |

|  |
| --- |
| A T A C A A G C A G T C T C T T T G A T A A A C T T A A G A A G G A G C C T G A T G C T T T A A C T T T G C T G G C A C C A G C T G C T G G |
| A G A C A C A A T C A T A T C T T T A G A T T T T G G C A G C A A T G A C A C A G A G A C T G A T G A C C A A C A A C T T G A G G A A G T T |
| C C A T T G T A C A A T G A T G T A A T G C T C C C C T C A T C T A A T G A G A A A C T G C A G A A T A T A A A T T T G G C A A T G T C T C |
| C A T T A C C T G C C T C T G A A A C T C C A A A G C C G C T T A G A A G T A G T G C C G A C C C T G C A C T C A A C C A A G A A G T T G C |
| A T T A A A G T T A G A A C C A A A T C C A G A G T C A C T G G A A C T T T C T T T C A C C A T G C C C C A G A T T C A A G A T C A G C C A |
| G C T A G T C C T T C T G A T G G A A G C A C C A G A C A A A G T T C A C C T G A G C C T A A C A G T C C C A G T G A A T A T T G T T T T G |
| A T G T G G A T A G T G A T A T G G T C A A T G A A T T C A A G T T G G A A T T G G T A G A G A A A C T T T T T G C T G A A G A T A C A G A |
| A G C A A A G A A T C C A T T T T C C A C T C A G G A C A C T G A T T T A G A C T T G G A G G T G T T A G C T C C T T A T A T C C C A A T G |
| G A T G A T G A C T T C C A G T T A C G T T C C T T T G A T C A G T T G T C A C C A C T G G A A A A C A G T T C T A C A A G T C C T C A A A |
| G T G C A A G C A C A A A T A C A G T A T T C C A G C C C A C T C A A A T G C A A G A A C C T C C T A T A G C C A C C G C C A C T A C C A C |
| C G C C A C C A A T G A T G A A T T G A A A A C A G T G A C A A A A G A T G G T A C G G A A G A C A T T A A A A T A C T G A T T G C A T T T |
| C C A T C T C C T C C C C A C G T A C C T A A A G A A C C T C C T T G T G C C A C A A C G T C A C C A T A T A G T G A T A C T G G A A G T C |
| GGACAGCCTCACCCAACAGAGCAGGAAA |

图3.2.4.3 低海拔绵羊*hif-1α*基因部分编码区序列

Fig. 3.2.4.3 Partial of sheep*hif-1α*gene coding sequence

表3.2.4.1 藏系绵羊、低海拔绵羊与若干物种*hif-1α*基因部分编码区序列相似性比较

Table 3.2.4.1 The partial coding region ofhif-1αamong Tibetan sheep, sheep and other species

| 物种  Species | 部分编码区相似性  Similarity of partial coding region(%) | Genbank 号  GenBank accession No |
| --- | --- | --- |
|  | Tibetan sheep sheep |  |
| Pantholops hodgsonii |  | JF267357 |
| Bos taurus | 98.75 98.68 | NM\_174339.3 |
| Bos grunniens | 98.60 98.53 | AY621118.1 |
| Homo sapiens | 91.67 91.52 | NM\_001530.3 |
| Pongo abelii | 91.59 91.52 | NM\_001133503.1 |
| Macaca fascicularis | 91.74 91.67 | AB169332.1 |
| Spermophilus tridecemlineatus | 91.32 91.17 | AY713478.1 |
| Eospalax cansus | 87.81 87.81 | EF584452.1 |
| Eospalax baileyi | 87.89 87.89 | DQ229099.1 |
| Spalax judaei | 88.99 88.91 | AJ715791.1 |
| Microtus kikuchii | 86.42 86.35 | HM125970.1 |
| Microtus oeconomus | 86.64 86.56 | DQ010149.1 |
| Rattus norvegicus | 86.42 86.49 | NM\_024359.1 |
| Mus musculus | 84.83 84.76 | NM\_010431.2 |

### 3.2.5 hif-2α基因的cDNA获得及序列分析

以藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊肺组织总RNA为模板，经RT-PCR扩增得到特异性目的条带（图3.2.5.1）。

采用TIANgel Midi Purification Kit纯化、回收扩增片段，并克隆于pGEM-T

Easy载体，经转化、酶切鉴定后，获得含有目的片段的阳性克隆送上海英骏有限公司测序。所得结果经人工校对，除去质粒载体序列后大小为515bp，与预期一致。利用DNAMAN软件将藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊该基因的部分编码区序列与已报道哺乳类的*hif-2α*进行相似性比较（表3.2.5.1）。结果表明，藏羚羊、

藏系绵羊、低海拔绵羊*hif-2α*与哺乳类*hif-2α*具有较高的相似性，为88%~98%左右，其中与牛的*hif-2α*序列高度相似，达到97.87%以上。由此确定本实验所克隆的序列为藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊*hif-2α*的部分编码区序列。此序列已提交到GenBank，获得登录号分别为JF267360、JF267367、JF267354（图3.2.5.2, 图3.2.5.3, 图3.2.5.4）。



图3.2.5.1 藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊*hif-2α*基因部分编码区片段的RT-PCR电泳图

Fig. 3.2.5.1 RT-PCR amplification products of *hif-2α*segment from Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep separated on gel.

|  |
| --- |
| >gi|343055669|gb|JF267360.1| Pantholops hodgsonii isolate 1 endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) mRNA, partial cds |
| T T C A C T C A T C C C T G C G A C C A T G A G G A G A T C C G T G A G A A C T T G A G T C T C A A A A A T G G C T C T G G T T T T G G G A |
| A G A A A A G C A A A G A C A T G T C C A C A G A G C G G G A C T T C T T C A T G A G G A T G A A G T G C A C G G T C A C C G A C A G A G G |
| CCGCACGG TC AACC T CAA G TCAGCC A C C T G G A A G G T C T T G C A C T G C A C G G G C C A G G T G A A G G T C T A C A G C |
| A A C T G C C C C C C T C A C A G C A G T C T C T G C G G C T G C A A G G A G C C G C T G C T G T C C T G C C T C A T C A T C A T G T G C G |
| A G C C G A T C C A G C A C C C G T C C C A C A T G G A C A T C C C A C T G G A C A G C A A G A C C T T C C T G A G C C G C C A C A G T A T |
| G G A C A T G A A G T T C A C C T A C T G C G A C G A C A G A A T C A C A G A A C T G G T T G G T T A C C A C C C T G A A G A G C T G C T T |
| G G C C G C T C A G C C T A T G A G T T C T A C C A T G C G C T G G A C T C A G A G A A C A T G A C C A A A A G C C A C C A G A A C T T G T |
| GCACCAAGGGTCAGGTGGTAAGTGG |

图3.2.5.2 藏羚羊*hif-2α*基因部分编码区序列

Fig. 3.2.5.2 Partial of Tibetan antelope*hif-2α*gene coding sequence

|  |
| --- |
| >gi|343055675|gb|JF267367.1| Ovis ammon isolate 1 endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) mRNA, partial cds |
| T T C A C T C A T C C C T G C G A C C A T G A G G A G A T C C G T G A G A A C T T G A G T C T C A A A A A T G G C T C T G G T T T T G G G A |
| A G A A A A G C A A A G A C A T G T C C A C A G A G C G G G A C T T C T T C A T G A G G A T G A A G T G C A C G G T C A C C A A C A G A G G |
| CCGCACGG TC AACC T CAA G TCAGCCACC TG GAAGG T C TTG CAC T GCA CGG G C C A G G T G A A G G T C T A C A G C |
| A A C T G C C C C C C T C A C A G C A G T C T C T G C G G C T G C A A G G A G C C G C T G C T G T C C T G C C T C A T C A T C A T G T G C G |
| A G C C G A T C C A G C A C C C G T C C C A C A T G G A C A T C C C A C T G G A C A G C A A G A C C T T C C T G A G C C G C C A C A G T A T |
| G G A C A T G A A G T T C A C C T A C T G C G G C G A C A G A A T C A C A G A A C T G G T T G G T T A C C A C C C T G A A G A G C T G C T T |
| G G C C G C T C A G C C T A T G A G T T C T A C C A T G C G C T G G A C T C A G A G A A C A T G A C C A A A A G C C A C C A G A A C T T G T |

GCACCAAGGGTCAGGTGGTAAGTGG

图3.2.5.3 藏系绵羊*hif-2α*基因部分编码区序列

Fig. 3.2.5.3 Partial of Tibetan sheep*hif-2α*gene coding sequence

|  |
| --- |
| >gi|343055666|gb|JF267354.1| Ovis aries isolate 1 endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) mRNA, partial cds |
| T T C A C T C A T C C C T G C G A C C A T G A G G A G A T C C G T G A G A A C T T G A G T C T C A A A A A T G G C T C T G G T T T T G G G A |
| A G A A A A G C A A A G A C A T G T C C A C A G A G C G G G A C T T C T T C A T G A G G A T G A A G T G C A C G G T C A C C G A C A G A G G |
| CCGCACGG TC AACC T CAA G TCAGCCACC TG GAAGG T C TTG CAC T GCA CGG GCCAGG T G AA GG T C T AC AGC |
| A A C T G C C C C C C T C A C A G C A G T C T C T G C G G C T G C A A G G A G C C G C T G C T G T C C T G C C T C A T C A T C A T G T G C G |
| A G C C G A T C C A G C A C C C G T C C C A C A T G G A C A T C C C A C T G G A C A G C A A G A C C T T C C T G A G C C G C C A C A G T A T |
| G G A C A T G A A G T T C A C C T A C T G C G A C G A C A G A A T C A C A G A A C T G G T T G G T T A C C A C C C T G A A G A G C T G C T T |
| G G C C G C T C A G C C T A T G A G T T C T A C C A T G C G C T G G A C T C A G A G A A C A T G A C C A A A A G C C A C C A G A A C T T G T |
| GCACCAAGGGTCAGGTGGTAAGTGG |

图3.2.5.4 低海拔绵羊*hif-2α*基因部分编码区序列

Fig. 3.2.5.4 Partial of sheep*hif-2α*gene coding sequence

表3.2.5.1 藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊与若干物种*hif-2α*基因部分编码区相似性比较

Table 3.2.5.1 The partial coding region ofhif-2αamongTibetan antelope, Tibetan sheep, sheep and other species

| 物种  Species | 部分编码区相似性  Similarity of partial coding region (%) Tibetan Tibetan Plain antelope sheep sheep | GenBank 号  GenBank accession No |
| --- | --- | --- |
| Bos taurus | 97.87 97.87 97.87 | BC142229 |
| Sus scrofa | 94.97 94.97 94.97 | NM\_001097420.1 |
| Homo sapiens | 93.81 93.81 93.81 | NM\_001430 |
| Mus musculus | 90.72 90.72 90.72 | NM\_010137 |
| Rattus norvegicus | 88.59 88.59 88.59 | NM\_023090 |

## 3.3 目的基因mRNA的表达结果

### 3.3.1 *stat3* mRNA的表达结果分析

利用Real-time PCR方法对藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织*stat3*

mRNA的分布特征，以及对藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的上述五种组织*stat3*

mRNA表达水平进行相对定量分析（图3.3.1.1～3.3.1.4）。结果表明，*stat3* mRNA

在藏羚羊的五种组织中均有表达。其中在肺中的表达量明显高于其他检测组织

（*P*<0.05）（表3.3.1.1）。三种动物同种组织之间比较发现，藏羚羊的五种组织中*stat3*

mRNA的表达量均高于低海拔绵羊(*P*<0.05)；藏羚羊肺、肝、肾、骨骼肌组织中

*stat3*mRNA的表达量高于藏系绵羊(*P*<0.05)，而心肌组织中*stat3*mRNA的表达量无显著差异；藏系绵羊肺、肝、心肌组织中*stat3* mRNA的表达量高于低海拔绵羊（*P*<0.05）（表3.3.1.2）。



图3.3.1.1 *stat3*基因扩增结果

Fig 3.3.1.1 Real-time PCR amplification results of *stat3* gene



图3.3.1.2 *stat3*基因熔解曲线结果

Fig 3.3.1.2 melting curve results of *stat3* gene



图3.3.1.3 18S rRNA基因扩增结果

Fig 3.3.1.3 Real-time PCR amplification results of 18S rRNA



图3.3.1.4 18S rRNA基因熔解曲线结果

Fig 3.3.1.4 melting curve results of 18S rRNA

表3.3.1.1 藏羚羊肺、肝、肾、心肌和骨骼肌*stat3* mRNA水平的比较

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Tissue | △CT | △△CT | 2−△△CT |
| Lung | 11. 73±0.05 | -2.3±0.05 | 4.93(4.77–5.09)\* |
| Liver | 13.40±0.02 | -0.62±0.03 | 1.54(1.51–1.57)\* |
| Kidney | 13.44±0.06 | -0.59±0.06 | 1.50(1.45–1.56)\* |
| Cardiac muscle | 13.96±0.07 | -0.07±0.07 | 1.06(1.02–1.1) \* |
| Skeletal muscle | 14.03±0.04 | 0.00±0.04 | 1.0 (0.97–1.03) |

Table 3.3.1.1 Comparison of the level of*stat3* mRNA among lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle in Tibetan antelope

△CT=CT(target genes) -CT(reference gene), △△CT=△CT(lung, liver, kidney and Cardiac muscle) -△CT (Skeletal muscle), 2一△△CT shows Variation multiples of the relative expression of target gene towards reference gene. mean±SD, n = 5. \* *P*<0.05 vs Skeletal muscle.

表3.3.1.2藏羚羊、藏系绵羊、地海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌stat3 mRNA水平的比较Table 3.3.1.2 Comparison of the level of stat3 mRNA in lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep

|  | Lung | Liver | Kidney | Cardiac muscle | Skeletal muscle |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| sheep | 1  (0.97–1.03) | 1  (0.97–1.03) | 1  (0.98–1.02) | 1  (0.97–1.34) | 1  (0.97–1.03) |
| Tibetan  sheep | 2.2  (2.17–2.25) \* | 1.53  (1.48-1.58) \* | 0.99  (0.97-1.01) | 1.29  (1.26–1.32) \* | 1.02  (1.0–1.04) |
| Tibetan antilope | 2.3  (2.26–2.42) \*# | 1.17  (1.15-1.19) \*# | 1.13  (1.08-1.17) \*# | 1.34  (1.28–1.41) \* | 1.15  (1.11–1.18) \*# |

2−ΔΔCT shows variation multiples of the relative expression of target gene towards reference gene. Mean±SD, *n* =

5. \**P*<0.05 *vs* sheep group; #*P*<0.05 *vs* Tibetan sheep group.

### 3.3.2 hif-1αmRNA的表达结果分析

利用Real-time PCR方法对藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织hif-1α

mRNA的分布特征，以及对藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的上述五种组织hif-1α

mRNA表达水平进行相对定量分析（图3.3.2.1～3.3.2.4）。结果表明，*hif-1α*mRNA

在藏羚羊的五种组织中均有表达。其中在肺中的表达量明显高于其他检测组织

（*P*<0.05）（表3.3.2.1）。三种动物同种组织之间比较发现，藏羚羊的五种组织中

*hif-1α*mRNA的表达量均高于藏系绵羊和低海拔绵羊(*P*<0.05)；藏系绵羊肺、肝、

肾组织中*hif-1α*mRNA的表达量高于平原绵羊(*P*<0.05)，而心肌和骨骼肌中*hif*-1α

mRNA的表达量无显著差异（表3.3.2.2）。



图3.3.2.1 *hif-1α*基因扩增结果

Fig 3.3.2.1 Real-time PCR amplification results of *hif-1α*gene



图3.3.2.2 *hif-1α*基因熔解曲线结果

Fig 3.3.2.2 melting curve results of *hif-1α*gene



图3.3.2.3 18S rRNA基因扩增结果

Fig 3.3.2.3 Real-time PCR amplification results of 18S rRNA



图3.3.2.4 18S rRNA基因熔解曲线结果

Fig 3.3.2.4 melting curve results of 18S rRNA

表3.3.2.1 藏羚羊肺、肝、肾、心肌和骨骼肌*hif-1α*mRNA水平的比较

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Tissue | ΔCT | ΔΔCT | 2−ΔΔCT |
| Lung | 10.87±0.02 | -2.18±0.02 | 4.54(4.47-4.59)\* |
| Liver | 12.20±0.03 | -0.85 ±0.03 | 1.81(1.77-1.84)\* |
| Kidey | 11.92±0.04 | -1.14 ±0.04 | 2.20(2.14-2.25)\* |
| Cardiac muscle | 12.79±0.03 | -0.26±0.03 | 1.20(1.18–1.22)\* |
| Skeletal muscle | 13.06±0.03 | 0.00 ±0.03 | 1.00(0.98–1.02) |

Table 3.3.2.1 Comparison of the level of*hif-1α*mRNA among lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle in Tibetan antelope

△CT=CT(target genes) -CT(reference gene), △△CT=△CT(lung, liver, kidney and Cardiac muscle) -△CT (Skeletal muscle), 2一△△CT shows Variation multiples of the relative expression of target gene towards reference gene. mean±SD, n = 5. \* *P*<0.05 vs Skeletal muscle.

表3.3.2.2藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌hif-1αmRNA水平的比较Table 3.3.2.2 Comparison of the level of hif-1αmRNA in lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep

|  | Lung | Liver | Kidney | Cardiac muscle | Skeletal muscle |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| sheep | 1  (0.98–1.02) | 1  (0.97–1.03) | 1  (0.97–1.03) | 1  (0.9–1.1) | 1  (0.9–1.1) |
| Tibetan  sheep | 14.2  (13.3–15.2) \* | 1.45  (1.4-1.48) \* | 1.28  (1.23-1.33) \* | 1.06  (1.0–1.1) | 1.1  (1.0–1.2) |
| Tibetan antilope | 21.6  (21.1–22.0) \*# | 1.69  (1.65–1.72) \*# | 1.37  (1.34-1.41) \*# | 2.85  (2.8–2.9) \*# | 2.89  (2.7–3.1) \*# |

2−ΔΔCT shows variation multiples of the relative expression of target gene towards reference gene. Mean±SD, *n* =

5. \**P*<0.05 *vs* sheep group; #*P*<0.05 *vs* Tibetan sheep group.

### 3.3.2 hif-2αmRNA的表达结果分析

利用Real-time PCR方法对藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织hif-2α

mRNA的分布特征，以及对藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的上述五种组织hif-2α

mRNA表达水平进行相对定量分析（图3.3.3.1～3.3.3.4）。结果表明，*hif-2α*mRNA

在藏羚羊的五种组织中均有表达。其中在肺中的表达量明显高于其他检测组织

（*P*<0.05）（表3.3.3.1）。三种动物同种组织之间比较发现，藏羚羊的五种组织中

hif-2αmRNA的表达量均高于低海拔绵羊(*P*<0.05)；藏羚羊肺、心肌、骨骼肌组

织中*hif-2α*mRNA的表达量高于藏系绵羊(*P*<0.05)，肝、肾组织中*hif-2α*mRNA的表达量却无显著性差异；藏系绵羊肺、肝、肾、心肌组织中*hif-2α*mRNA的表达量高于低海拔绵羊（*P*<0.05），而骨骼肌组织中*hif-2α*mRNA的表达量无显著性差异（表3.3.3.2）。



图3.3.3.1 *hif-2α*基因扩增结果

Fig 3.3.3.1 Real-time PCR amplification results of *hif-2α*gene



图3.3.3.2 *hif-2α*基因熔解曲线结果

Fig 3.3.3.2 melting curve results of *hif-2α*gene



图3.3.3.3 18S rRNA基因扩增结果

Fig 3.3.3.3 Real-time PCR amplification results of 18S rRNA



图3.3.3.4 18S rRNA基因熔解曲线结果

Fig 3.3.3.4 melting curve results of 18S rRNA

表3.3.3.1 藏羚羊肺、肝、肾、心肌和骨骼肌*hif-2α*mRNA水平的比较

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Tissue | ΔCT | ΔΔCT | 2−ΔΔCT |
| Lung | 8.62 ± 0.04 | -3.22± 0.04 | 9.31(9.07-9.55)\* |
| Liver | 15.21±0.03 | 3.37±0.03 | 0.097(0.094-0.099)\* |
| Kidey | 15.16±0.03 | 3.32±0.03 | 0.1(0.098-0.102)\* |
| Cardiac muscle | 11.77 ± 0.04 | -0.07± 0.04 | 1.05(1.02–1.08)\* |
| Skeletal muscle | 11.84± 0.04 | 0.00 ± 0.04 | 1(0.97–1.03) |

Table 3.3.3.1 Comparison of the level of*hif-2α*mRNA among lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle in Tibetan antelope

△CT=CT(target genes) -CT(reference gene), △△CT=△CT(lung, liver, kidney and Cardiac muscle) -△CT (Skeletal muscle), 2一△△CT shows Variation multiples of the relative expression of target gene towards reference gene. mean±SD, n = 5. \* *P*<0.05 vs Skeletal muscle.

表3.3.3.2藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌hif-2αmRNA水平的比较Table 3.3.3.2 Comparison of the level of hif-2αmRNA in lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep

|  | Lung | Liver | Kidney | Cardiac muscle | Skeletal muscle |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| sheep | 1  (0.98-1.02) | 1  (0.97-1.03) | 1  (0.98-1.02) | 1  (0.98-1.02) | 1  (0.98–1.02) |
| Tibetan  sheep | 1.82  (1.77-1.87)\* | 1.16  (1.13-1.18)\* | 1.12  (1.1-1.14)\* | 2.65  (2.58-2.72)\* | 1  (0.98-1.02) |
| Tibetan antilope | 5.27  (5.14-5.41)\*# | 1.18  (1.16-1.22)\* | 1.14  (1.12-1.16)\* | 4.31 (4.18–4.44)\*# | 3.37  (3.28–3.46) \*# |

2−ΔΔCT shows variation multiples of the relative expression of target gene towards reference gene. Mean±SD, *n* =

5. \**P*<0.05 *vs* sheep group; #*P*<0.05 *vs* Tibetan sheep group.

## 3.4 目的蛋白的表达结果

### 3.4.1 STAT3蛋白的表达结果分析

利用Western blot方法对STAT3蛋白在藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织中的表达量进行检测。结果表明（图3.4.1.1～3.4.1.3），STAT3蛋白与mRNA水平出现较为一致的变化。藏羚羊五种组织之间比较，STAT3蛋白在肺组织中的表达量最高(*P*<0.05)。与藏系绵羊比较，藏羚羊的STAT3蛋白在这五种组织中的表达量明显增高；与低海拔绵羊比较，藏羚羊的STAT3蛋白在这五种组织中的表达量明显增高（*P*<0.05）；藏系绵羊与低海拔绵羊相比较，藏系绵羊的STAT3蛋白在这五种组织中的表达量明显增高（*P*<0.05）。

**A**





B



C





图3.4.1.1 藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌STAT3蛋白的Western blot结果

Fig. 3.4.1.1Western blot results of STAT3 in lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle, among Tibetan antelope (*A*), Tibetan sheep (*B*) and sheep (*C*).



图3.4.1.2 藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌STAT3蛋白表达水平的比较

Fig. 3.4.1.2 Comparison of the level of STAT3 protein in lung, liver、kidney、cardiac muscle and skeletal muscle of Tibetan antelope. Mean±SD, *n* = 5. \**P*<0.05 *vs* skeletal muscle.



＃

＃

＃

＃

＃

图3.4.1.3藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌STAT3蛋白表达水平的比较Fig. 3.4.1.3 Comparison of the level of STAT3 protein in lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep. Mean±SD, *n* = 5. \**P*<0.05 *vs* sheep group; #*P*<0.05 *vs* Tibetan sheep group.

### 3.4.2 HIF-1α蛋白的表达结果分析

利用Western blot方法对HIF-1α蛋白在藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊的相应五种组织中的表达量进行检测。结果表明(图3.4.2.1～3.4.2.3)，HIF-1α蛋白与mRNA水平出现较为一致的变化。藏羚羊五种组织之间比较，HIF-1α蛋白在肺组织中的表达量最高(*P*<0.05)。与低海拔绵羊比较，藏羚羊和藏系绵羊的HIF-1α蛋白在这五种组织中的表达量明显增高（*P*<0.05）；藏羚羊与藏系绵羊比较，藏羚羊在这五种组织内HIF-1α蛋白的表达量高于藏系绵羊（*P*<0.05），同时该因子在藏羚羊肺、心肌和骨骼肌组织中表达量的增高趋势尤为明显。

A





B





C







﹡

图3.4.2.1 藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌HIF-1α蛋白的Western blot结果Fig. 3.4.2.1Western blot results of HIF-1αin lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle, among Tibetan antelope (*A*), Tibetan sheep (*B*) and sheep (*C*).

图3.4.2.2藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌HIF-1α蛋白表达水平的比较

Fig. 3.4.2.2 Comparison of the level of HIF-1αprotein in lung, liver、kidney、cardiac muscle and skeletal muscle of Tibetan antelope. Mean±SD, *n* = 5. \**P*<0.05 *vs* skeletal muscle.





﹡＃

﹡＃

﹡

﹡＃

﹡

﹡＃

﹡

﹡＃

﹡

图3.4.2.3藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌HIF-1α蛋白表达水平的比较Fig. 3.4.2.3 Comparison of the level of HIF-1αprotein in lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep. Mean±SD, *n* = 5. \**P*<0.05 *vs* sheep group; #*P*<0.05 *vs* Tibetan sheep group.

### 3.4.3 HIF-2α蛋白的表达结果分析

利用Western blot方法对HIF-2α蛋白在藏羚羊、藏系绵羊和低海拔绵羊的相应五种组织中的表达量进行检测。结果表明(3.4.3.1～3.4.3.3)，HIF-2α蛋白与

mRNA水平出现较为一致的变化。藏羚羊五种组织之间比较，HIF-2α蛋白在肺组织中的表达量最高(*P*<0.05)。与低海拔绵羊比较，藏羚羊和藏系绵羊的HIF-2α蛋白在这五种组织中的表达量明显增高（*P*<0.05）；藏羚羊与藏系绵羊比较，藏羚羊这五种组织内HIF-2α蛋白的表达量高于藏系绵羊（*P*<0.05）。

A



B





C

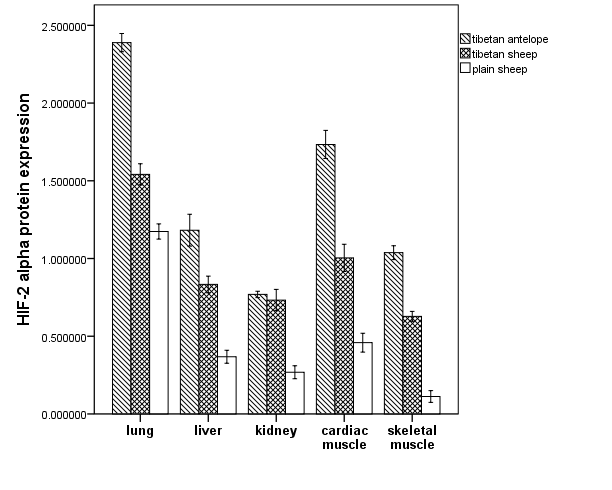


图3.4.3.1藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌HIF-2α蛋白的Western blot结果Fig. 3.4.3.1Western blot results of HIF-2αin lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle, among Tibetan antelope (*A*), Tibetan sheep (*B*) and sheep(*C*)



图3.4.3.2藏羚羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌HIF-2α蛋白表达水平的比较

Fig. 3.4.3.2 Comparison of the level of HIF-2αprotein in lung, liver、kidney、cardiac muscle and skeletal muscle of Tibetan antelope. Mean±SD, *n* = 5. \**P*<0.05 *vs* skeletal muscle.



＃

＃

＃

＃

图3.4.3.3藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的肺、肝、肾、心肌、骨骼肌HIF-2α蛋白表达水平的比较Fig. 3.4.2.3Comparison of the level of HIF-2αprotein in lung, liver, kidney, cardiac muscle and skeletal muscle among Tibetan antelope, Tibetan sheep and sheep. Mean±SD, *n* = 5. \**P*<0.05 *vs* sheep group; #*P*<0.05 *vs* Tibetan sheep group.

# 第四章 讨论

生物体都需应对生存外环境和机体内环境变化所引起的各种压力，如大气氧含量、温度、湿度、辐射、营养物质的摄取、金属和化学毒素、微生物等。为了生存，生物体采用多种方式来适应这些压力，从瞬间调节机体代谢弥补非显著性压力的影响到遗传背景改变来长期对抗显著性压力，最终达到机体与环境间的和谐统一。

生活在青藏高原的土著动物面临严重缺氧的自然环境压力。经过长期的进化过程，它们为适应这种特定的环境压力，表现出形态结构、生理功能、生化反应、行为习性等方面的表型变化。这些生物性状的变化归根结底是由于机体内诸多抗低氧基因在转录、翻译水平上发生了可调节改变。在众多的抗低氧基因产物中，

STAT3、HIF-1α、HIF-2α是氧信号转导系统的核心转录因子，它们对于调节细胞低氧适应性反应、维持机体氧平衡状态和能量平衡状态起着关键性作用。

藏羚羊是分布于西藏和青海大部以及新疆南缘、四川西北部和甘南西南部分地区的高原特有物种。与其他高原土著动物相比较，该物种具有如下特点：（1）据化石资料记载，藏羚羊至少于更新世早期就已存在，它对高海拔缺氧环境有着极强的适应能力[65]；（2）因存在繁殖季节的性别隔离行为，种群间的基因流十分丰富，因而具有较高的遗传多样性，成为了独特的高原低氧适应基因型群体[65]。基于以上特点，藏羚羊是研究高原低氧适应机制的理想模型。本研究以藏羚羊为研究对象，通过与藏系绵羊、低海拔绵羊比对，分析*stat3*、hif-1α、*hif-2α*因子的组织差异性表达，探讨藏羚羊应对高原环境低氧的生存机制。 1、STAT3

STAT3是STATs的重要成员之一，最初是在研究IL-6的信号传递中作为急性期反应因子(acute phase response factor, APRF)被发现和纯化的[66]。作为重要的信号级联成分，STAT3的活化受JAK2、Src等非受体型酪氨酸激酶、丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)参与的多个信号通路的调节。活化的STAT3通过整合多种胞外刺激信号并转入核内，调控众多的下游靶基因表达，从而调节细胞的生长、增殖、分化及凋亡过程。作为分布及作用十分广泛的信号转导与转录激活蛋白，STAT3在正常组织细胞中的表达是快速、短暂的，但在低氧状态下的组织细胞中却表现为高表达和持续性激活。研究证实，STAT3表达增高和激活是HIF-1α基础表达不可或

缺的因素[67]，它能够上调*hif-1α*mRNA的转录[68]，阻止HIF-1α的降解，使组织中HIF-1α的表达量增高，有效调节诸多参与氧代谢的HIF-1α下游靶基因的转录，维持机体的氧平衡状态[69]；低氧状态下高表达及活化的STAT3和HIF-1α可同时结合于VEGF的启动子区域，与转录共活化因子CBP/p300和redox factor-1(Ref-1) /apurinic/apyrimidinic endonuclease(APE)形成分子络合物，上调VEGF的转录，促进新生血管的形成[70]；过表达的STAT3可上调iNoS、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, CoX-2)、锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnsoD)、VEGF、细胞周期蛋白Dl(cyclin Dl)，凋亡抑制蛋白(survivin)等心肌存活基因或保护因子，下调促凋亡基因Bax，降低心肌细胞内活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)的水平，减轻ROS对心肌细胞的损伤，起到保护心肌的作用[71-75]；同时STAT3能够与呼吸链复合物Ⅰ和Ⅱ相互作用产生能量，并通过上调解偶联蛋白1（Uncoupling proteins 1, UCP1），维持机体的能量代谢平衡[25, 26]。以上研究结果说明，表达增高及活化的STAT3可诱导其下游的抗低氧基因表达，参与心肌保护、新生血管形成等多种生理功能的调节，并维持着能量平衡状态。从而在细胞的低氧适应性反应中发挥至关重要的作用。

本实验以藏羚羊作为实验材料，获得藏羚羊*stat3*基因的cDNA克隆。基因序列分析确证该cDNA序列包含2312bp的开放阅读框、29bp的5′UTR区和1947bp的

3′UTR区。与已报道哺乳类的*stat3*序列进行相似性比较（图3.2.1.3,表3.2.1.1）。结果显示无论是编码区序列还是氨基酸序列，藏羚羊*stat3*与哺乳类*stat3*的相似性达到86% ~ 98%左右，其中与牛的*stat3*序列相似性更高，达到98.06%以上。构建的哺乳类STAT3的分子进化树显示(图3.2.1.4)，STAT3进化树与传统的物种系统进化关系基本一致，藏羚羊与牛归为一支。表明本实验获得藏羚羊*stat3*基因的cDNA序列。

Real-time PCR和Western blot结果显示（表3.3.1.1和图3.4.1.1-3.4.1.3），*stat3*在所检测的藏羚羊不同组织中均有明显表达且存在表达的组织差异性；藏羚羊、藏系绵羊STAT3蛋白在肺、肝、肾、心肌、骨骼肌组织中的表达量明显高于低海拔绵羊。说明环境低氧诱导STAT3蛋白高表达促进STAT3活化形式的产生，从而有效调节VEGF、CoX-2、MnSOD、UCP1、HIF-1α及其下游靶基因等的转录，增强藏羚羊、藏系绵羊肺通气能力、心脏泵血功能以及能量代谢等方面的低氧适应性，提高它们氧传输系统的功效，以及氧利用能力和能量生成的功能，确保体

内的氧平衡状态和能量平衡状态。提示STAT3作为藏羚羊、藏系绵羊氧信号转导系统中的关键性信号级联成分，其组织特异性表达及表达增高对于低氧环境下藏羚羊、藏系绵羊生命功能正常运转起着重要作用。

以低海拔绵羊为对照，比较分析藏羚羊、藏系绵羊的Real-time PCR检测结果显示（表3.3.1.2），藏羚羊、藏系绵羊*stat3* mRNA的表达变化趋势并不一致。藏羚羊*stat3* mRNA在肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织中的表达量均高于低海拔绵羊；藏系绵羊*stat3* mRNA的表达量在肺、肝、心肌组织中高于低海拔绵羊，肾和骨骼肌中表达无差异。藏羚羊和藏系绵羊肺、肝、心肌组织中*stat3* mRNA表达增高，可能与快速诱导心肌存活基因、*hif-1*α及其下游因子肺表面活性物质

[99]的表达，加强与线粒体的相互作用，增强心脏泵血功能，肺通气能力，促进肝

脏中糖、脂、蛋白质的新陈代谢反应，提高氧的摄取，传输功能，并为机体提供活动所需能量有关。*stat3* mRNA在藏羚羊骨骼肌组织中的表达量明显高于藏系绵羊和低海拔绵羊，可能与该物种为适应残酷的生存环境，必需具备快速奔跑的运动能力和逃避天敌捕食的避险反应能力相关联。

2、HIF-1

HIF-1是分布及作用十分广泛的重要氧依赖转录激活因子。它除了作为

STAT3的下游靶基因，与STAT3共同参与VEGF基因的表达调控，促进新生血管形成的低氧适应性生理功能产生外，还可诱导细胞存活、无氧代谢等方面众多抗低氧基因的表达，参与细胞内氧平衡状态的调节，在低氧适应机制中发挥至关重要的作用[76]。目前，HIF-1在高原低氧适应性的研究中备受关注。现已明确，HIF-1以异源二聚体的形式存在于细胞内，其中氧调节亚基HIF-1α是影响该因子表达水平、蛋白质稳定性，促转录活性的主要因素[77–81]。至今已有不同研究组对牦牛、藏鸡、高原鼠兔等高原土著动物HIF-1α的组织表达情况进行了研究。结果显示，*hif-1α*mRNA在高原土著动物的多种组织中均有表达， 表现出明显的组织差异性。与对照组相比较，高原土著动物hif-1αmRNA在各组织中的表达量普遍增高

[82–86]。HIF-1α蛋白在牦牛和高原鼠兔各组织中的表达也存在组织差异性，且明显

高于对照组[86, 87]。以上研究结果说明，HIF-1α的低氧特异性表达可能是高原土著动物适应高原低氧环境的分子基础。

本实验以藏羚羊作为实验材料，获得藏羚羊hif-1α基因的cDNA克隆。基因序列分析确证该cDNA序列包含2471 bp的开放阅读框和1191 bp的3′UTR区。基于

HIF-1α氨基酸序列的系统进化分析表明（图3.2.3.4），藏羚羊与牛聚成一个单系的分支，显示出彼此较近的亲缘关系，这与传统的物种系统进化关系基本一致。与已报道哺乳类的HIF-1α序列进行相似性比较（图3.2.3.3和表3.2.3.1），结果显示无论是编码区序列还是氨基酸序列，藏羚羊hif-1α与哺乳类hif-1α具有较高的相似性，为87%~99%左右，其中与牛的hif-1α序列高度相似，达到98.95%以上，说明HIF-1α在生物进化上较为保守。

Real-time PCR和Western blot结果显示（表3.3.2.1, 图3.4.2.1-3.4.2.3），*hif*-1α在所检测的藏羚羊不同组织中均有明显表达且存在表达的组织差异性。与低海拔绵羊相比较，藏羚羊、藏系绵羊HIF-1α蛋白的表达量在肺、肝、肾、心肌、骨骼肌组织中呈明显增高趋势。这与高原鼠兔、牦牛等其它高原土著动物HIF-1α蛋白的组织特异性表达及表达增高的低氧表达特征相一致[82–87]。环境低氧诱导HIF-1α蛋白高表达可以有效地调节葡萄糖转运蛋白GLUT、糖酵解相关酶、VEGF、EPO、肌红蛋白(myoglobin, Mb)、肺表面活性物质[99]等诸多参与氧代谢的下游靶基因转录，从而确保高原土著动物能够最大限度地摄取及利用氧，保持机体内的氧平衡状态，因此HIF-1α蛋白的组织特异性表达及表达增高可能是高原土著动物所具有的共性，也是维持环境低氧下生物体生命功能正常运转的分子基础。

以低海拔绵羊为对照，比较分析藏羚羊、藏系绵羊的Real-time PCR检测结果

（表3.3.2.2）显示，藏羚羊、藏系绵羊*hif-1α*mRNA的表达变化趋势并不一致。藏羚羊*hif-1α*mRNA在肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织中的表达量均高于低海拔绵羊；藏系绵羊*hif-1α*mRNA的表达量在肺、肝、肾组织中高于低海拔绵羊，心肌和骨骼肌中表达无差异。提示藏羚羊和藏系绵羊虽同为高原土著动物，但是hif-1α的表达调控机制可能在mRNA、蛋白、核定位和转录活化作用等多水平上各有侧重，其具体机制还有待进一步研究。

与藏系绵羊比较，为了能够在高海拔、严重低氧环境下生存，同时满足快速奔跑、有效逃避天敌捕食的需求，藏羚羊经过长期的自然选择，其动脉血氧饱和度、肺Ⅱ型细胞含量、肺通气储备能力、心室壁厚度、肌肉组织中线粒体含量明显高于藏系绵羊；其肺通气能力、心脏泵血功能以及能量代谢方面的低氧适应能力明显强于藏系绵羊。可见藏羚羊机体代谢、各脏器功能发生了有别于藏系绵羊的适应性改变。藏羚羊、藏系绵羊适应性改变的差异不仅体现在两者的生理功能方面，更为本质的是藏羚羊、藏系绵羊hif-1α基因的表达也存在差异。本研究通

过比较藏羚羊、藏系绵羊*hif-1α*mRNA和蛋白的表达水平发现，藏羚羊五种组织中*hif-1α*mRNA和蛋白的表达量明显高于同海拔动物藏系绵羊。提示藏羚羊hif-1α

mRNA和蛋白呈现的高表达态势，有利于HIF-1α蛋白在细胞核内快速累积，进而迅速诱导参与氧代谢HRG的活化，提高藏羚羊的氧摄取、转运、组织弥散和利用，提高其运动能力和避险反应能力，从而使藏羚羊能够在高原低氧环境中生存和繁衍。藏系绵羊作为家养动物，虽生活于高原低氧环境，但不需要快速奔跑活动，因此其hif-1αmRNA和蛋白的表达量介于藏羚羊和平原绵羊之间。

3、HIF-2

作为HIFs家族的另一主要成员，HIF-2同样是重要的氧依赖转录激活因子。与HIF-1的分子组成一致，HIF-2以异源二聚体的形式存在于细胞内，氧调节亚基HIF-2α是影响HIF-2表达水平、蛋白质稳定性，促转录活性的主要因素。HIF-2α自身的表达主要受低氧因素的诱导，低氧条件下，其所调控的下游靶基因与HIF-lα有重叠但更为特异。通过调节这些特异性的靶基因，HIF-2α发挥：1）促进红细胞生成和成熟。HIF-2α与EPO的HRE相互作用，在诱导EPO生成的调控中起主要作用[88]；HIF-2α参与十二指肠细胞色素b(duodenal cytochrome b, DcytB)、二价金属转运蛋白1(divalent metal transporter 1, DMT1)等小肠铁吸收相关基因的表达和铁摄取，对肠铁吸收存在着精细的调节作用[89]；HIF-2α激活血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)基因的转录，调节红细胞生成所需的造血微环境，促进幼稚红细胞成熟[90]。2) HIF-2α显著上调VEGF及其受体的转录水平。有实验表明，在小鼠肺发育过程中，HIF-2αmRNA和VEGF mRNA在13.5～15.5天的胚胎中表达均较低，在17.5天后，两者的表达量均明显增加，一直到肺发育成熟都保持较高水平，而HIF-lαmRNA在整个肺的发育过程中表达均不明显。在人的内皮细胞中，HIF-2α表达与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)表达也较一致[91, 92]。Akeno等[93]发现，在MG63造骨细胞中，低氧诱导HIF-2α蛋白含量增加，同时VEGF增强子活性及VEGF mRNA表达亦明显增加，HIF-2α蛋白增加先于VEGF mRNA的增加。而HIF-lα不能诱导VEGF增强子活性及VEGF mRNA表达增加。可见，HIF-2α较HIF-lα更易与VEGF增强子结合，且HIF-2αmRNA在不同组织内的表达和VEGF mRNA的表达较为一致。3) HIF-2α促进肺表面活性物质的形成，增强肺组织的顺应性和通气能力，HIF-2α促进低氧条件下肺泡Ⅱ型细胞中血红蛋白的表

达，加强机体对氧的摄取和运输[94,95]。4）HIF-2α参与脂类氧化磷酸化产生能量，以满足各组织器官生理功能运转的需求，保持机体的能量平衡状态[96]等生物学功能。此外，在慢性低氧环境下，HIF-1α的表达趋势为先上升后下降，HIF-2α则呈现稳定高表达。与HIF-1α相比较，HIF-2α具有对慢性低氧更为敏感的特点[97, 98]。基于上述生理功能和特点，HIF-2α特异性调节血红蛋白合成、红细胞生成、血管新生、肺表面活性物质的形成以及脂类氧化磷酸化的分解代谢过程，进而维持机体的氧平衡状态和能量平衡状态，有效地促进生物体对低氧的适应。

本实验以藏羚羊作为实验材料，获得藏羚羊hif-2α基因的cDNA克隆。基因序列分析显示该cDNA克隆为藏羚羊hif-2α基因的部分编码区序列。利用DNAMAN软件将该序列与已报道哺乳类的*hif*-2α相应序列进行相似性比较（表3.2.5.1），结果显示藏羚羊hif-2α与哺乳类hif-2α具有较高的相似性，核苷酸序列相似性为88%

~ 97%左右。其中与牛的hif-2α序列相似性最高，这进一步确证该序列为藏羚羊

hif-2α的部分编码区序列。

Real-time PCR和Western blot结果显示（表3.3.3.1, 图3.4.3.1-3.4.3.3），*hif*-2α在所检测的藏羚羊不同组织中均有明显表达且存在表达的组织差异性；藏羚羊、藏系绵羊HIF-2α蛋白在肺、肝、肾、心肌、骨骼肌组织中的表达量明显高于低海拔绵羊。表明环境低氧诱导HIF-2α蛋白高表达，特异性调节VEGF、EPO、肺表面活性物质等靶基因的转录，增强藏羚羊、藏系绵羊肺通气能力、血管新生、红细胞生成、血红蛋白合成以及脂质生物氧化等方面的低氧适应性，提高它们的氧摄取、转运、利用能力和能量生成的功能。可见高原低氧条件下，在血管新生、红细胞及能量生成等方面，HIF-2α发挥的调控功能互补于HIF-1α，提示HIF-1α和HIF-2α是以协同作用的方式，维持机体的氧平衡状态及能量平衡状态，促进藏羚羊、藏系绵羊对低氧的适应。

以低海拔绵羊为对照，比较分析藏羚羊、藏系绵羊的Real-time PCR检测结果显示（表3.3.3.2），藏羚羊、藏系绵羊*hif-2α*mRNA的表达变化趋势并不一致。藏羚羊*hif-2α*mRNA在肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织中的表达量均高于低海拔绵羊；藏系绵羊*hif-2α*mRNA的表达量在肺、肝、肾、心肌组织中高于低海拔绵羊，骨骼肌中表达无差异。藏羚羊和藏系绵羊肺、肝、肾、心肌组织中hif-2α

mRNA表达增高，可能与快速诱导其下游因子VEGF、EPO、肺表面活性物质[99]

的表达，加强脂质氧化磷酸化反应，进而增强肺的通气能力，心脏泵血功能，肾

脏的EPO合成以及肝脏的物质代谢反应，以满足机体活动所需的氧及能量。hif-2α

mRNA在藏羚羊肺、心肌、骨骼肌组织中的表达量明显高于同海拔动物藏系绵羊，可能与藏羚羊hif-2αmRNA快速翻译成蛋白质，并在细胞核内累积，进而迅速诱导其下游HRG的活化，提高藏羚羊的氧摄取、转运、组织弥散和利用，提高其运动能力和避险反应能力，从而使藏羚羊能够在高原低氧环境中生存和繁衍。

综上所述，本实验在获得藏羚羊*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*的cDNA克隆的基础上，比较藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊的*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*基因的组织表达情况，得出藏羚羊*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*基因存在组织特异性高表达的结论。结合前人的研究成果，认为藏羚羊能在青藏高原这一严重低氧、人烟罕至、生物贫乏的残酷环境下生存、繁衍与其内在的STAT3、HIF-1α和HIF-2α因子及下游诸多抗低氧基因的表达有着内在的相关性。上述因子间所存在的调控机制可引起藏羚羊心、肺、肝、肾、骨骼肌等器官功能的适应性改变。揭示在高原低氧环境下，藏羚羊具有强大生命力的关键是其遵从优胜劣汰、适者生存的自然规律，最终达到机体与环境间的和谐统一。

参 考 文 献

[1] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(4): 266-276.

[2] Storz JF, Scott GR, Cheviron ZA. Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates[J]. J Exp Biol, 2010, 213 (Pt24): 4125-4136.

[3] 蔡全林. 西藏绵羊、ft羊、黄牛、牦牛生理指标测定[J]. 中国兽医杂志, 1980, 2: 44-46.

[4] Beall C M, Decker M J, Brittenham G M, et al. An ethiopian pattern of human adaptation to high altitude hypoxia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(26): 17215- 17218.

[5] Heath D, Edwards C. The pulmonary arteries of the yak[J]. Cardio Res, 1984, 8 (3): 133-139.

[6] Ge RK, Kubo T, Kobayashi T, et al. Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent Ochotona curzoniae (pika) at high altitude[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1998, 274(5 Pt2): H1792-H1799.

[7] Avivi A, Resnick M B, Nevo E, et al. Adaptive hypoxic tolerance in the subterranean mole rat Spalax ehrenbergi: the role of vascular endothelial growth

Factor[J]. FEBS Lett, 1999, 452(3):133-140.

[8] Ge RL, Chen QH, Wang LH, et al. High exercise performance and lower VO2 max in Tibetan than Han residents at 4700 m altitude[J]. J Appl Physiol, 1994, 77(2): 684-691.

[9] Storz JF, Sabatino SJ, Hoffmann FG, et al. The molecular basis of high altitude adaptation in deer mice[J]. PLOS Genetics, 2007, 3(3): 448-459.

[10] Xu SQ, Yang YZ, Zhou J, et al. A mitochondrial genome sequence of the Tibetan antelope (Pantholops hodgsonii)[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2005, 3(1): 5-17.

[11] Yang YZ, Droma YD, Jin GE, et al. Molecular cloning of hemoglobin alpha-chain gene from pantholops hodgsonii, a hypoxic tolerance species[J]. Biochem Mol Biol, 2007, 40(3): 426-431.

[12] Zhang XF, Yang YZ, Pei ZW, et al. Comparisons of endocrine hormones levels between Tibetan antelope and Tibetan sheep[J]. Sheng Li Xue Bao, 2011, 63(4): 342-346. [Article in Chinese]

[13] Chang R, Ma Y, Bai ZZ, et al. Improved cardiac characteristics in Tibetan Antelope during adaptation to high altitude[J]. American Journal of Veterinary Research (In press).

[14] Fu XY, Schindler C, Improta T, et al. The proteins of ISGF23, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1992, 89(16): 7840-7843.

[15] Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et al. Signaling through the JAK/ STAT pathway, recent advances and future challenges[J]. Gene, 2002, 285(1-2): 1-24. [16] Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, et al. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites[J]. EMBO J, 1996, 15(20): 5616-5626.

[17] Strehlow I, Schindler C. Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation [J]. J Biol Chem, 1998, 273(43): 28049-18056.

[18] Begitt A, Meyer T, van Rossum M, et al. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(19): 10418-10423.

[19] Zhang T, Kee WH, Seow KT, et al. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for

Its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(19):7132-7139. [20]Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, et al. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA[J]. Cell, 1998, 93(5):827-839. [21]ChenZ, Han ZC. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis[J]. Med Res Rev, 2008, 28 (2):185-200.

[22] Leeman RJ, Lui VW, Grandis JR. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2006, 6(3): 231-241.

[23] Leinninger GM, Jr Myers MG. LRb signals act within a distributed network of leptin-responsive neurones to mediate leptin action[J]. Acta Physiol (Oxf), 2008, 192 (1): 49-59.

[24] Gong W, Wang L, Yao JC, et al. Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 prediets expression of vascular endothelial growth factor in and angiogenic phenotype of human gastrie cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(4): 1386-1393.

[25] Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration[J]. Science, 2009, 323(5915): 793-797.

[26] Okamatsu-Ogura Y, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, et al. Possible involvement of uncoupling protein 1 in appetite control by leptin[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2011, 236(11): 1274-1281.

[27] Lu Y, Zhou J, Xu C, et al. JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 21(4): 305-314.

[28] Haghikia A, Stapel B, Hoch M, et al. STAT3 and cardiac remodeling[J]. Heart Fail Rev, 2011, 16(1): 35-47.

[29] Gu Q, Kong Y, Yu ZB, et al. Hypoxia-induced SOCS3 is limiting STAT3 phosphorylation and NF-κB activation in congenital heart disease[J]. Biochimie, 2011, 93(5): 909-920.

[30] Jung-Hyun M, Yang HF, Ivan M, et al. Structure of an HIF-1α–pVHL Complex: Hydroxyproline Recognition in Signaling[J]. Science, 2002, 296(5574): 1886-1889. [31] Kirsty SH, Christopher JS. The HIF pathway as a therapeutic target[J]. DDT, 2004, 9(16): 704-711.

[32] Semenza GL. HIF- l: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2000, 88(4): 1474-1480.

[33] 张彩彩, 朱依纯. 低氧诱导因子-1功能调节及其机制[J]. 生理通讯, 2008, 27(2): 43-46.

[34] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeuties[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(4Suppl): S62-S67.

[35] Martin-Puig S, Temes E, Olmos G, et al. Role of Iron (II) -2-Oxoglutarate- Dependent Dioxygenases in the Generation of Hypoxia-induced Phosphatidic Acid through HIF-1/2 and von Hippel-Lindau-independent Mechanisms[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 9504-9511.

[36] Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, et al. Cooperative Interaction ofHypoxia-inducible Factor-2 alpha (HIF-2 alpha) and Ets-1 in the Transcriptional Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (Flk-1) [J]. J Biol Chem, 2003, 278(9): 7520-7530.

[37] Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, et al. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor1 {alpha} (HIF-1 {alpha}) and HIF-2 {alpha} in Hypoxic Gene Regulation[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(24): 9361- 9374.

[38] Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2αin development and disease[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(4): 628-634.

[39] Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical[J]. Mol Cell, 2010, 29(5): 435-442.

[40] 马玲, 金玉楠, 于艳秋. 缺氧诱导因子新进展[J]. 解剖科学进展, 2009, 15(2): 237-241.

[41] Depping R, Steinhoff A, SehindlerS G, et al. Nuclear translocation of hypoxia- inducible factors(HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta Pathway[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(3): 394-404.

[42] Chin BY, Jiang G, Wegiel B, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104 (12): 5109-5114.

[43] Shi LB, Huang JH, Han BS. Hypoxia inducible factor-1alpha mediates protective effects of ischemic preconditioning on ECV-304 endothelial cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(16): 2369-2373.

[44] Riddle RC, Khatri R, Schipani E, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in angiogenic-osteogenic coupling[J]. Mol Med, 2009, 87(6): 583-590.

[45] Shi H. Hypoxia inducible factor 1 as a therapeutic target in ischemic stroke[J].

Curr Med Chem, 2009, 16(34):4593-4600.

[46] Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, et al. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms[J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(9): 1084-1101.

[47] Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. Tumor hypoxia: the role of HIF[J]. Actas Urol Esp, 2009, 33(9): 941-951.

[48] Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption[J]. Cell Metab, 2006, 3(3): 187-197.

[49] Adams JM, Difazio Lhypoxia T, Rolandelli RH, et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia[J]. Acta Physiol Hung, 2009, 96(1): 19–28.

[50] Beall CM. ADAPTATIONS TO ALTITUDE: A Current Assessment [J]. Annual Review of Anthropology, 2001, 30(l): 423-456.

[51] Wiesener MS, Turley H, Allen WE, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-l alPha[J]. Blood, 1998, 92(7): 2260-2268.

[52] Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(4): 642-649.

[53] 杨盛力, 张万广, 陈孝平等. 缺氧诱导因子-1 与缺氧诱导因子-2 同肿瘤关系的比较[J]. 肝胆外科杂志, 2007, 15(6): 471-474.

[54] Flamme I, Frohlich T, Reutern M, et al. HRF, a putative basic helix–loop-helix- PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1alpha and developmentally expressed in blood vessels[J]. Mech Dev, 1997, 63(1): 51-60. [55] Hu CJ, Sataur A, Wang L, et al. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1αand HIF-2α[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(11): 4528-4542.

[56] Ema M, Taya S, Yokotani N, et al. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development Sogawa[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94 (9): 4273-4278.

[57] Tian H, McKnight SL, Russell D W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells[J]. Genes Dev, 1997, 11(9): 72-82.

[58] Rosenberger C, Mandriota S, Jurgenses JS, et al. Expression of hypoxia-inducible factor -1 alpha and -2 alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(7): 1974–1976.

[59] Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs[J]. FASEB J, 2003, 17(2): 271-273.

[60] Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, et al. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1α(HIF-1α) and HIF-2αin hypoxic gene regulation[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(24): 9361-9374.

[61] 赵小祺, 王春光. 缺氧诱导因子-1 研究进展[J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(5): 73-75.

[62] Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. Genome-wide association of hypoxia- inducible factor (HIF) -1 alpha and HIF-2 alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts[J]. J Biol Chem, 2009, 284(25): 16767- 16775.

[63] Filby CE, Hooper SB, Wallace MJ. Partial pulmonary embolization disrupts alveolarization in fetal sheep[J]. Respir Res, 2010, 11: 42.

[64] Livak K J and Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[65] G. B. Sehaller. Wildlife of the Tibetan Steppe. University of Chicago Press, 1998, Chicago.

[66] Akira S, NishioY, Inoue M, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gP130-mediated signaling pathway[J]. Cell, 1994, 77(1): 63-71.

[67] Xu Q, Briggs J, Park S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways[J]. Oneogene, 2005, 24 (36): 5552-5560.

[68] Niu G, Briggs J, Deng J, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 alpha RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(7): 1099-1105.

[69] Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[J]. Physiology, 2009, 24: 97-106.

[70] Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, et al. HIF-l alpha, STAT3, CBP/P300 and Ref- 1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas[J]. Oncogene, 2005, 24(19): 3110-3120.

[71] Boengler K. Isehemia/reperfusion injury: The benefit of having stat3 in the heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 4(50): 587-588.

[72] Alten JA, Moran A, Tsimelzon AI, et al. Prevention of hypovolemic circulatory eollapse by i1-6 activated stat3[J]. PLoS One, 2008, 2(3): 605.

[73] Barry SP, Townsend PA, McCormick J, et al. Stat3 deletion sensitizes cells to oxidative stress[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 3(385): 324-329. [74] Yamauchi-Takihara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling[J]. Trends Cardiovasc Med, 2000, 10(7): 298-303.

[75] Stephanou A, Latchman DS. Transcriptional regulation of the heat shock proteingenes by STAT family transcription factors[J]. Gene Expr, 1999, 7(4-6): 311-319. [76] Semenza GL. Oxygen homeostasis[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010, 2(3): 336-361.

[77] Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(1): 610-616. [78] Zagórska A, Dulak J. HIF -1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing[J]. Acta Biochim Pol, 2004, 51(3): 563-585.

[79] GroulxI, LeeS. Oxygen-dependentubiquitinationanddegradationof hypoxia-induciblefactorrequiresnuclear-cytoplasmictraffickingofthevon Hippel-Lindau tumor suppressor protein[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(15): 5319-5336. [80] Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Berta MA, et al. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(6): 971-980.

[81] Ema M, Hirota K, Mimura J, et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 alpha in response to hypoxia: Their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300[J]. EMBO J, 1999, 18(7): 1905-1914. [82] Wang CF, Wu CX, Li N. Differential gene expression of hypoxia inducible factor-1αand hypoxic adaptation in chicken[J]. Hereditas, 2007, 29(1): 75-80 (Chinese, English abstract).

[83] Zhao TB, Zhao XQ, Chang Z, et al. Tissue specific expression of plateau pikas

(Ochotona curzoniae) HIF-1α mRNA under normal oxygen[J]. Zool Res, 2004, 25(2): 132-136 (Chinese, English abstract).

[84] Zhao TB, Ning HX, Zhu SS, et al. Cloning of hypoxia inducible factor 1α(HIF-1α) cDNA from a high hypoxia tolerant mammal-plateau pika (Ochotona curzonize)[J]. Biochem Biphys Res Commun, 2004, 316(2): 565-572.

[85] Dolt KS, Mishra MK, Karar J, et al. cDNA cloning, gene organization and variant specific expression of HIF-1 alpha in high altitude yak (Bos grunniens)[J]. Gene, 2007, 386(1–2): 73-80.

[86] Wang DP, Li HG, Li YJ, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha cDNA cloningand its mRNA and protein tissue specific expression in domestic yak (Bos grunniens) from Qinghai-Tibetan plateau[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348(1): 310-319.

[87] Li HG, Ren YM, Guo SC, et al. The protein level of hypoxia-induciblefactor-1alpha is increased in the plateau pika (Ochotona curzoniae) inhabiting high altitudes[J]. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2009, 311(2): 134-141.

[88] Koistinen PO, Rusko H, Irjala K, et al. EPO, red cells and serum transferring receptor in continuous and intermittent hypoxia[J]. Med Sci Sports Exerc, 2000, 32(4): 800-804.

[89] Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, et al. HIF-2a, but not HIF-1a, promotes iron absorption in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(5): 1159-1166.

[90] Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, et a1. The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2alpha through VCAM-1 in endothelial cells[J]. Blood, 2008, 112(4): 1482-1492.

[91] Bougatef F, Menashi S, Khayati F, et al. EMMPRIN promotes melanoma cells malignant properties through a HIF-2 alpha mediated up regulation of VEGF receptor-2[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12265.

[92] Giatromanolaki A, Bai M, Margaritis D, et al. Hypoxia and activated VEGF/receptor pathway in multiple myeloma[J]. Anticancer Res, 2010, 30(7): 2831-2836.

[93] Akeno N, Czyzyk-Krzeska MF, Gross T S, et al． Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible Factor-2alpha[J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 959-962. [94] Rajatapiti P, de Rooij JD, Beurskens LW, et al. Effect of oxygen on the expression

Of hypoxia-inducible factors in human fetal lung explants[J]. Neonatology, 2010, 97 (4):346-354.

[95] Grek CL, Newton DA, Spyropoulos DD, et al. Hypoxia up-regulates expression of hemoglobin in alveolar epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(4): 439-447.

[96] Rankin EB, Rha J, Selak MA, et al. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(16): 4527-4538.

[97] Mazzeo RS, Reeves JT. Adrenergic contribution during acclimatization to high altitude: perspectives from Pikes Peak[J]. Exerc Sport Sci Rev, 2003, 31(l): 13-18. [98] RuPert JL, Monsalve MV, Devine DV, et al. Beta 2-adrenergic receptor allele frequencies in the Quechua, a high altitude native population [J]. Ann Hum Genet, 2000, 64(Pt2): 135-143.

[99] Saini Y, Harkema JR, LaPres JJ. HIF1alpha is essential for mnormal intrauterine differentiation of alveolar epithelium and surfactant production in the newborn lung of mice[J]. J Biol Chem, 2008, 283(48): 33650–33657.

# 第五章 结论

通过对藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*基因的克隆及表达分析，我们得出如下结论：

1.获得藏羚羊*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*基因的cDNA克隆，与已报道哺乳类同一基因编码区序列、氨基酸序列进行同源性比较后，发现这些基因与牛相应基因序列的相似性很高。此外，本实验还获得藏系绵羊、低海拔绵羊*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*基因的部分编码区序列。上述基因序列已提交至GeneBank并获得序列号，为以后相关基因的研究提供依据。

2.比较分析藏羚羊、藏系绵羊、低海拔绵羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌五种组织中*stat3*、*hif-1α*和*hif-2α*基因mRNA和蛋白的表达情况，发现青藏高原的低氧环境压力驱动藏羚羊、藏系绵羊*stat3*、hif-1α、*hif-2α*基因在mRNA、蛋白不同层面发生了各自特异性的表达适应性变化，继而提高藏羚羊、藏系绵羊在低氧环境压力下生存的适合度。

3. 同海拔藏羚羊和藏系绵羊*stat3*、hif-1α、hif-2α基因mRNA和蛋白的表达状况存在差异，提示藏羚羊和藏系绵羊存在不同的低氧适应机制。

4. STAT3、HIF-1α和HIF-2α作为氧信号转导通路中的重要转录因子，通过调控着维系氧平衡状态和能量平衡状态的众多下游低氧适应性基因的表达，很好的应对环境氧含量的变化，保持机体内环境的稳定。本研究发现藏羚羊、藏系绵羊肺、肝、肾、心肌、骨骼肌组织中*stat3*、hif-1α和hif-2α的表达高于低海拔绵羊，说明藏羚羊、藏系绵羊*stat3*、hif-1α、hif-2α能迅速动员其下游低氧适应性基因的表达，快速调整心肺、血液、运动等系统的功能适应性改变，以整体的角度适应青藏高原的低氧环境。因此，*stat3*、hif-1α和hif-2α表达水平的增加可能构成藏羚羊、藏系绵羊对高原低氧适应机制的分子基础。

# 第六章 文献综述

**信号转导与转录活化因子3与新生血管形成**

信号传导与转录激活因子（signal transducers and activators of transcription,

STATs）是潜在的细胞质转录因子家族，通过对细胞因子、生长因子等多肽类配体的胞外信号感应，其家族成员发生酪氨酸残基磷酸化，形成同源或异源二聚体移入细胞核内，激活诸多下游靶基因，发挥它们的生理功能[1,2]。STATs家族包括STAT1, STAT2，STAT3，STAT4，STAT5a，STAT5b，STAT6七个成员。在细胞增殖、分化、凋亡、炎症和癌变等方面发挥重要的生理作用[3, 4]，目前，越来越多的证据表明STATs，尤其是STAT3，在生理和病理上对新生血管生成起着重要作用[5-8]。

血管新生涉及内皮细胞增殖、基底膜和细胞外基质的选择性降解、内皮细胞迁移和管状结构的形成等过程[9]。很多疾病都包含血管新生现象。新生血管形成过多或者太少都会导致疾病发生，例如风湿性关节炎、癌症、心血管疾病等[10]。血管新生是一个多步骤的复杂过程，有多种蛋白因子参与此过程[11,12]。其中，血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）为新生血管生成的最重要调节因子之一[13]。STAT3正是通过对VEGF的调控来参与调节血管新生过程[14, 15]。本文将重点讨论STAT3在肿瘤血管生成和心脏血管生成中所起的关键作用。

##### **1.** **STAT3**在肿瘤血管生成中的作用

正常生理状态下，STAT3的激活是快速而短暂的，仅维持数分钟到几小时，对于正常细胞的生长、分化等生理功能起着重要的作用。STAT3的异常激活则表现出致癌的作用。STAT3是EGFI、IL-6/JAK、Src等多个致癌性酪氨酸激酶信号通路的汇聚焦点，在多种肿瘤细胞中均发现有持续性过度激活。STAT3过度激活可诱导与细胞增殖、分化、凋亡密切相关基因的异常高表达，通过各种途径促进细胞增殖、恶性转化、阻碍细胞凋亡，从而触发了肿瘤的形成和发展。目前人类多种恶性肿瘤中均发现有STAT3的持续激活，现STAT3已被认为是一种癌基因。STAT3在肿瘤中的作用主要表现为：促进细胞增殖、抑制细胞凋亡；促进肿瘤的侵袭和转移；免疫逃避；促进肿瘤血管形成。

为获得肿瘤生长和转移所需的营养物质，肿瘤的发生发展离不开新生血管生

成。已知有多种生长因子和细胞因子参与了肿瘤生成的调控，其中VEGF起着关键作用。STAT3在血管生成中的作用是在鼠黑色素瘤细胞中发现VEGF是STAT3的直接靶基因而得到首次证实的[16]。然后Wei等[17]在人胰腺癌细胞中证实VEGF启动子上存在STAT3结合位点，STAT3可直接结合于VEGF的启动子，上调胰腺癌细胞VEGF的表达。STAT3也通过调控HIF-1α表达间接调控VEGF的转录

[18]. Jung等[19]在肾癌细胞中发现STAT3可以抑制HIF-lα的降解，增加HIF-lα的合成，与HIF-1α共同调节肿瘤细胞VEGF的转录。而Gray等[20]在胰腺癌和前列腺癌的研究中发现，低氧状态下磷酸化STAT3和HIF-1α可同时结合于VEGF的启动子区域，并与转录共活化因子CBP/p300和Ref-1/APE形成一种分子络合物，上调VEGF的转录，促进肿瘤新生血管的形成。最近，Wang等[21]发现VEGF在体外可诱导卵巢癌细胞内STAT3发生磷酸化；且STAT3的磷酸化参与了VEGF在卵巢癌细胞内通过VEGFR2介导的信号转导过程，说明STAT3和VEGF之间可能存在一种循环机制，即STAT3上调VEGF的表达，而VEGF又通过自分泌机制与细胞表面的VEGFRs的结合进一步激活细胞内的STAT3。另外，研究发现STAT3可以调控bFGF等其他血管生成因子的表达[22]。bFGF通过诱导内皮细胞的迁移、增殖、分化和调节肿瘤细胞中VEGF的表达来参与血管生成。而且

bFGF和VEGF结合到它们的受体上，从而在内皮细胞中转导受体信号来激活STAT3[23-25]。因此，STAT3的活化对于内皮细胞增殖、迁移、微血管的形成是必须的。

在常氧状态下，生长因子和细胞因子对于血管生成过程中的VEGF调节是否会起到重要作用至今仍未得到明确的解释。事实上，生长因子和细胞因子在人类肿瘤中通过多种信号通路参与以VEGF为媒介的血管生成过程。在结肠癌细胞中，类胰岛素生长因子1（insulin-like growth factor 1, IGF-1）引发的低氧诱导因子1（hypoxia inducible factor 1, HIF-1）通过MAPK和P13K/Akt通路来调制VEGF表达[26]。转化生长因子β1 (transforming growth factor beta 1, TGF-β1)能够通过Sp1（specific protein 1），以旁分泌和/或自分泌的方式刺激VEGF 基因转录。研究表明，生长因子和细胞因子的血管生成作用是由STATs特别是STAT3介导的[5,27-29]。近期发现白介素6(interleukin-6, IL-6)的潜在血管生成作用证实了STAT3在肿瘤血管生成中的关键性调节作用。

作为一种多功能细胞因子，IL-6 可以调整免疫、血细胞生成等反应[30]。在

肿瘤组织中IL-6的表达与肿瘤形成密切相关。IL-6作为子宫颈癌，基底细胞瘤，神经胶质瘤，胃癌以及间皮瘤血管生成中至关重要的细胞因子而备受关注[27,31-34]。同时这些研究都证明IL-6依赖STAT3信号通路促进由VEGF诱导的肿瘤血管形成。在子宫颈癌细胞中，IL-6诱导的VEGF表达取决于STAT3的活化程度。利用磷酸化STAT3-/-突变体阻断STAT3通路可以有效抑制IL-6介导的VEGF mRNA上调作用[27]。提示子宫颈癌细胞中IL-6介导VEGF mRNA上调依赖于STAT3通路。与子宫颈癌中血管生成作用相似，IL-6与胃癌的血管生成密切相关。胃癌中IL-6主要借助于VEGF增加新生血管生成，而应用JAK2抑制剂，AG490可以有效抑制由IL-6诱导的VEGF活化作用。表明JAK/STAT3通路参与IL-6信号刺激胃癌细胞中VEGF基因活化的过程[33]。神经系统中，IL-6的血管生成作用同样取决于STAT3. IL-6诱导试管内鼠的大脑微脉管内皮细胞的增殖和毛细血管形成[35]。在神经胶质瘤中IL-6依赖STAT3信号通路来诱导VEGF的转录活化作用并促进肿瘤血管生成。STAT3-/-突变体转染NIH3T3 细胞和

U87MG细胞后完全抑制IL-6介导的VEGF表达，因此证明STAT3在受IL-6调节的VEFG表达中是必需的[32]。上述研究结果均说明STAT3是人类肿瘤中一种公共的血管生成调节因子。

##### **2.** **STAT3** 在心脏血管形成中的作用

除了调节肿瘤血管生成，生理条件下STAT3作为血管生成的调节因子在后天心脏血管形成中发挥作用。VEGF基因敲除可减少冠状动脉微血管的形成，表明VEGF 是心脏中重要的血管生成的旁分泌因子之一[36]。STAT3 参与心脏中

VEGF的调节过程。STAT3是心脏血管形成中的正调节因子。活化的STAT3过表达可上调VEGF，同时伴随肌肉内微血管密度增加，表明STAT3的活化调控体内肌肉组织的血管生长[6]。心肌梗塞的局部缺血预处理会诱导血管生成，在此过程中STAT3 会被激活[37]。此外，心肌梗塞之后，粒性白细胞集落刺激因子

（granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF）依赖STAT3的促血管生成作用参与心脏的重塑过程。同时，G-CSF刺激心脏梗塞区域中内皮细胞数量的增加。表明G-CSF借助STAT3的活化诱导心脏血管生成因子的表达，但此过程中VEGF的含量是否会同时增加尚未可知。

近期研究表明，在诱导血管生成过程中，STAT3也会抑制抗血管形成基因的表达[38]。STAT3 基因敲除后可提高组织金属蛋白酶抑制剂因子1、结缔组织

生长因子和凝血酶制敏蛋白1等抗血管形成因子的表达，从而抑制VEGF活性、促进内皮细胞凋亡、改变血管外基质组成，发挥抗血管生成功能[39-42]. STAT3信号转导通路也可引发肿瘤细胞中IFN-β、IFN-γ等抗血管形成抑制因子分泌，促进血管新生[43-45]。因此，活化的STAT3不仅通过提高血管生成因子的表达，同时还通过减少血管抑制因子来诱导血管生成。

然而，并不能完全排除STAT3可以通过系统而不通过VEGF旁分泌路径调节血管生长。最近证实，STAT3除了能够通过旁分泌系统促进血管生成，还可以直接诱导心脏干细胞内皮化，这说明，STAT3信号转导途径在血管生成中具有新的作用[46]。

##### **3.** **STAT3**在其他组织器官血管生成中的作用

病理条件下，STAT3促进血管生成的作用范畴已超越了肿瘤疾病和心血管疾病。视网膜病变和大脑缺血等情况下，新生血管生成的主要调控因子同样是

STAT3.

血管生成对于眼睛的生理和病理都是至关重要的。最近的调查表明，STAT3不仅在哺乳动物眼睛的形成中起着重要作用[47]，而且在视网膜的新生血管生成过程中扮演重要角色。研究表明，视网膜新生血管生成过程中STAT3的表达和激活作用都得到提升，这意味着STAT3在视网膜生成血管时具有潜在的作用[48]。在缺血诱导的视网膜新生血管形成的动物模型中，激活STAT3会在产后15天和

18天时显著增加，而且STAT3的表达量在视网膜外部血管明显多于内部血管[48]。在视网膜形成早期，STAT3-/-明显抑制瘦素诱导的VEGF mRNA表达，表明瘦素可通过视网膜细胞中STAT3的活化作用，增加VEGF mRNA表达[28]。虽然缺血后血管生成的作用机制尚不清楚，但已有研究表明，神经细胞、内皮细胞和大脑皮层缺血后的星型细胞中STAT3的活化作用可能有助于大脑缺血后血管生成的调节[49,50]。此外，G-CSF作为血管生成因子不但可以增强血管生成，在病灶性大脑缺血后还可以减少缺血性损伤[51]。有证据表明G-CSF会激活STAT3和STAT5，增加VEGF表达，同时它还会激活成年大鼠大脑内的内皮细胞增殖功能[52]。

##### **4.** **STAT3**对**VEGF**表达的转录调节

VEGF基因启动子包括Sp1、Egr-1、AP-2、AP-1、HIF1-α、STAT3、Erα等转录因子的结合位点，它们可能会参与VEGF的转录调节过程[7,53-55]。然而，这些转录因子在调节VEGF基因时的作用截然不同。Sp1和HIF1在大多数情况下

主要参与VEGF的转录调节，而其它转录因子只是在特定情况下参与VEGF的转录调节。例如，缺氧条件下HIF-1能激活许多基因的转录功能，如血管生成、物质代谢、细胞生存。HIF-1是调节VEGF基因的主要物质[56]。Sp1也参与多种刺激引导的VEGF转录上调功能[32,57,58]。AP-1在缺氧导致的VEGF表达中并非必要条件，但它在由血小板生长因子（platelet-derived growth factor, PDGF）调节的VEGF表达机制是必不可少的[57]。近期研究表明，STAT3结合VEGF远侧启动子可引导细胞因子、生长因子、多种致癌蛋白甚至缺氧导致的VEGF表达的信号[7,8,32,27,28,60,61-63]，这说明STAT3是VEGF基因表达的关键性调节因子。STAT3可能利用不同的机制来调节VEGF的转录活化作用。在v-Src转染的NIH3T3细胞中，激活的STAT3结合在VEGF启动子848位置的范围内，直接驱动VEGF转录发生[7]。相反，IL-6借助STAT3信号增加VEGF转录时，STAT3结合VEGF启动子的范围只包括Sp1和Sp3的结合位点，并不包括STAT3结合部位，尽管

STAT3和Sp1通过相互靠近的STAT3和Sp1结合部位共同作用激活启动子，但这也不能说明VEGF的转录增加，是因为VEGF启动子只包含Sp1的结合位点。因此，IL-6激活STAT3可能利用了新的转录调节机制。这种新的机制可能是增强DNA结合活动、增加Sp1的转录活动、触发构造的变化和RNA聚合酶（RNA Polymerase, RNAP）的异构以及DNA通过与Sp1和其它共活化因子的相互作用来引起VEGF基因的转录上调。具体细节有待进一步研究。

除了激活VEGF转录功能之外，STAT3还能通过与肿瘤细胞中HIF1-α的相互作用增强缺氧反应中VEGF的转录功能[63]。STAT3结合部位与HIF-1结合部位临近，相隔越100bp，免疫共沉淀和染色质免疫沉淀反应分析发现STAT3与HIF-1共同作用于VEGF启动子上[63]。低氧情况下，STAT3、HIF-1、转录共激活子CBP/p300、Ref-1/APE形成复合转录单元结合与VEGF启动子进行转录调节[64]。

终上所述，STAT3作为VEGF基因转录的重要调节因子，在新生血管生成的调控中起核心作用。提示STAT3可成为肿瘤及其它血管生成疾病治疗的靶标。目前，诸多学者就STAT3在血管生成中发挥的作用进行了深入的研究，但是其确切转录调节机制尚不清楚，因此对STAT3在血管生成调节中的作用机理需进一步验证之后，方可对促进或防止血管生成的治疗提出更好的策略。

参 考 文 献

[1] Darnell JE Jr. STATs and gene regulation[J]. Science, 1997, 277(5332): 1630- 1635.

[2] Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: Transcriptional control and biological impact[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(9): 651-662.

[3] Calo V, Migliavacca M, Bazan V, et al. STAT proteins: From normal control of cellular events to tumorigenesis[J]. J Cell Physiol, 2003, 197(2): 157-168.

[4] Yu H, Jove R. The STATs of cancer—Newmolecular targets come of age[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2): 97-105.

[5] Valdembri D, Serini G, Vacca A, et al. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathwayduring angiogenesis induced by GM-CSF[J]. FASEB J, 2002, 16(2): 225-227. [6] Osugi T, Oshima Y, Fujio Y, et al. Cardiac-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 6676–6681.

[7] Niu G, Wright KL, Huang M, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis[J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2000-2008.

[8] Wei D, Le X, Zheng L, et al. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis[J]. Oncogene, 2003, 22(3): 319-329.

[9] Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process[J]. Curr Mol Med, 2003, 3(7): 643-651.

[10] Sivakumar B, Harry LE, Paleolog EM. Modulating angiogenesis: Morevs less[J]. JAMA, 2004, 292(8): 972-977.

[11] Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, et al. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis[J]. Q J Nucl Med, 2003, 47(3): 149-161.

[12] Simons M. Integrative signaling in angiogenesis[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 264(1-2): 99-102.

[13] Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(4): 549-580.

[14] Xie TX, Wei D, Liu M, et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2004, 23(20): 3550-3560.

[15] Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, et al. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3188-3196.

[16] Niu G, Wright KL, Huang M, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis[J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2000-2008.

[17] Wei D, Le X, Zheng L, et a1. STAT3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis[J]. Oncogene, 2003, 22(3): 319-329.

[18] Xu Q, Briggs J, Park S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways[J]. Oncogene, 2005, 24(36): 5552-5560.

[19] Jung JE, Lee HG, Cho IH, et a1. STAT3 is a potential modulator of HIF-l-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells[J]. FASEB J, 2005, 19(10): 1296-1298.

[20] Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, et a1. HIF-l alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas[J]. Oncogene, 2005, 24(19): 3110-3120.

[21] Wang FF, Chen HZ, Xie X, et a1. Phosphorylation of Stat3 induced by vascular endot-helial growth factor in ovarian carcinoma cell line in vitro[J]. Zhong hua Fu Chan Ke Za Zhi, 2004, 39(6): 385-389.

[22] Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, et al. Activation of Stat3 in human melanoma promotes brain metastasis[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3188-3196.

[23] Deo DD, Axelrad TW, Robert EG, et al. Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet- activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism[J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21237-21245. [24] Bartoli M, Platt D, Lemtalsi T, et al. VEGF differentially activates STAT3 in micro-vascular endothelial cells[J]. FASEB J, 2003, 17(11): 1562-1564.

[25] Schaefer LK, Ren Z, Fuller GN, et al. Constitutive activation of Stat3 alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2) [J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2058-2065. [26] Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, et al. Insulin-like growth factor1 induces hypoxia-inducible factor1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAPkinase and phosphatidylinositol3-kinase signaling in

Colon cancer cells[J]. JbiolChem, 2002, 277(41):38205-38211.

[27] Wei LH, Kuo ML, Chen CA, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway[J]. Oncogene, 2003, 22(10): 1517-1527.

[28] Suganami E, Takagi H, Ohashi H, et al. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: Possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells[J]. Diabetes, 2004, 53(9): 2443-2448.

[29] Tomida M, Saito T. The human hepatocyte growth factor (HGF) gene is transcriptionally activated by leukemia inhibitory factor through the Stat binding element[J]. Oncogene, 2004, 23(3): 679-686.

[30] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL) -6-type cytokine signalling and its regulation[J]. Bio chem J, 2003, 374(Pt1): 1-20.

[31] Jee SH, Chu CY, Chiu HC, et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways[J]. J invest Dermatol, 2004, 123(6): 1169-1175.

[32] Loeffler S, Fayard B, Weis J, et al. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes invivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1[J]. Int J Cancer, 2005, 115(2): 202-213.

[33] Huang SP, Wu MS, Shun CT, et al. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma[J]. J Biomed Sci, 2004, 11(4): 517-527.

[34] Adachi Y, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, et al. Interleukin-6 induces both cell growth and VEGF production in malignant mesotheliomas[J]. Int J Cancer, 2006, 119(6): 1303-1311.

[35] Fee D, Grzybicki D, Dobbs M, et al. Interleukin6 promotes vasculogenesis of murine brain microvessel endothelial cells[J]. Cytokine, 2002, 12(6): 655-665.

[36] Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP, et al. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10): 5780-5785.

[37] Fukuda S, Kaga S, Sasaki H, et al. Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 36(4): 547-559.

[38] Hilfker-Kleiner D, Hilfker A, Fuchs M, et al. Signal transducer and activator of

Ranscription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury[J]. Circ Res, 2004, 95(2): 187- 195.

[39] Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, et al. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis[J]. FASEB J, 2002, 16(2): 219-221.

[40] Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, et al. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(22): 12485-12490.

[41] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigmentepithelium-derived factor[J]. Nat Med, 2002, 8(4): 349-357.

[42] Edelberg JM, Reed MJ. Aging and angiogenesis[J]. Front Biosci, 2003, 8: s1199- s1209.

[43] Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, et al. Tumor cell responses to IFN gamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis[J]. Immunity, 1998, 9(1): 25-34.

[44] Dong Z, Greene G, Pettaway C, et al. Suppression of angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis by human prostate cancer cells engineered to produce interferon-beta[J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 872-879.

[45] Burdelya L, Kujawski M, Niu G, et al. Stat3 activity in melanoma cells affects migration of mmune effector cells and nitricoxide-mediated antitumor effects[J]. J Immunol, 2005, 174(7): 3925-3931.

[46] Mohri T, Fujio Y, Maeda M, et al. Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac stem cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(10): 6442-6447. [47] Zhang SS, Wei JY, Li C, et al. Expression and activation of STAT proteins during mouse retina development[J]. Exp Eye Res, 2003, 76(4): 421-431.

[48] Mechoulam H, Pierce EA. Expression and activation of STAT3 in ischemia-induced retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(12): 4409-4416. [49] Justicia C, Gabriel C, Planas AM. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: Signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes[J]. Glia, 2000, 30(3): 253-270.

[50] Suzuki S, TanakaK, Nogawa S, et al. Phosphorylation of signal transducer and

Activator of transcription-3 (Stat3) after focal cerebral ischemia in rats[J]. Exp Neurol, 2001, 170(1):63-71.

[51] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances Angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2005, 1058(1-2): 120-128.

[52] Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates neurogenesis via vascular endothelial growth factor with STAT activation[J]. Brain Res, 2006, 1073-1074: 190-201.

[53] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing[J]. J Biol Chem, 1991, 266(18): 11947-11954.

[54] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by Hypoxia-inducible factor1[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(9): 4604-4613.

[55] Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(20): 10972-10977.

[56] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.

[57] Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, et al. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression[J]. Oncogene, 1997, 15: (6) 669-676.

[58] Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, et al. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61(10): 4143-4154.

[59] Finkenzeller G, Technau A, Marme D. Hypoxia-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is independent of functional AP-1 transcription factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 208(1): 432-439.

[60] Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, et al. Signal transducer and activator of transcription3 is required forglycoprotein130-mediated induction of vascula rendothelial growth factor in cardiac myocytes[J]. J Biol Chem, 2000, 275(14): 10561- 10566.

[61] Platt DH, Bartoli M, El-Remessy AB, et al. Peroxynitrite increases VEGF expression in vascular endothelial cells via STAT3[J]. Free Radic Biol Med, 2005,

39(10): 1353-1361.

[62] Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, et al. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and

Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas[J].

Oncogene, 2005, 24(19): 3110-3120.

[63] Jung JE, Lee HG, Cho IH, et al. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells[J]. FASEB J, 2005, 19(10): 1296- 1298.

[64] Xu Q, Briggs J, Park S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways[J]. Oncogene, 2005, 24(36): 5552-5560.

# 在校期间发表的论文

1. 刘芳,格日力. 藏羚羊组蛋白去乙酰化酶1基因编码区的克隆与序列分析.兽类学报,2011,4 (31):396-403.

2. 刘芳,乌仁塔娜,马兰,杨应忠,格日力. 藏羚羊低氧诱导因子1α基因的克隆与组织表达.生理学报,2011,63(6):565-573.

3. Fang Liu, Zhuming Bi, Eric Xu, Ke Xu, Qing Ga, Quanyu Yang, Yingzhong Yang, Lan Ma, Tana Wuren, Rili Ge. An Integrated Systems Approach to Plateau Ecosystem Management– A Scientific Application in Qinghai and Tibet Plateau. IEEE Systems Journal, accepted.

致 **谢**

本论文是在导师格日力教授悉心指导和严格要求下完成的。导师在课题设计和论文撰写等方面给予了精心指导，他孜孜不倦的求学精神，严谨求实的科学作风，缜密的科学思维方式和废寝忘食的工作精神将使我受益终身。在此论文完成之际，谨向导师致以最衷心的感谢。

衷心感谢导师李占全教授在课题设计方面给予的细心指导和大力支持。

感谢研究生办公室和高原医学研究中心各位老师及同学给予的热心帮助和大力支持。在此，特别感谢青海大学魏登帮教授，祁得林教授，张得均教授和中国科学院西北高原生物研究所郭松长研究员在课题设计和论文撰写等方面所给予的精心指导，以及王丽华老师、陈英老师、嘎琴老师、杨全余老师所给予的无私帮助。

最后真诚感谢给予我理解、支持、帮助的家人和朋友。

# 学位论文独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文系在导师指导下本人独立完成的研究成果。文中依法引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：1．交回学院授予的学位证书；

2．学院可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学院规定的方式，对因不当取得学位给学院造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

# 学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属学院。学院享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为青海大学。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

（本声明的版权归青海大学所有，未经许可，任何单位及任何个人不得擅自使用）